

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Luisa Hrabcová

Vliv imunitní odpovědi hostitele na sání a plodnost flebotomů

The effect of the hosts immune response on sand fly bloodfeeding and fecundity

Diplomová práce

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Luisa Hrabcová

Poděkování

Děkuji mému školiteli, prof. RNDr. Petrovi Volfovi, CSc., za vedení mé diplomové práce, za jeho čas, cenné připomínky, laskavost a podporu. Velké poděkování patří celé Laboratoři biologie hmyzích vektorů za poskytnutí přátelského až rodinného zázemí. Zvláště pak RNDr. Michalovi Šimovi Ph.D., RNDr. Tatianě Spitzové Ph.D., RNDr. Jitce Myškové Ph.D., Mgr. Tomášovi Macháčkovi a Mgr. Karlovi Harantovi děkuji za pomoc s metodikou a nekonečnou trpělivost a povzbuzení. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Pavlovi a Standovi - za vše.

ABSTRAKT

Hlavním cílem této diplomové práce bylo ověřit, zda sání krve se specifickými protilátkami proti slinám flebotoma má vliv na jeho fekunditu a mortalitu. Pro většinu pokusů byl použit *Phlebotomus argentipes* a jako hostitel křeček syrský (*Mesocricetus auratus*). Metodou ELISA bylo prokázáno, že při opakované expozici hostitele flebotomům dochází ke vzniku vysokých hladin protilátek. Studium mortality a fekundity samic pět dní po nasátí však prokázalo, že sání na opakovaně pobodaných křečcích nemá vliv na počet nakladených vajec ani přežívání samic.

K charakterizaci antigenů *P. argentipes* rozpoznávaných sérem opakovaně pobodaných křečků byl využit imunobloting a hmotnostní spektrometrie. Imunobloting ukázal, že protilátky v křečcích sérech rozeznávají slinné proteiny o molekulové hmotnosti mezi 25 a 60 kDa. Pomocí hmotnostní spektrometrie byly identifikovány antigeny odpovídající proteinům z rodiny D7, apyráz, antigen 5-related proteinů a yellow-related proteinů.

V další části diplomové práce bylo sáním flebotomů králíčí krve přes kuřecí membránu zjišťováno, zda vysoké koncentrace histaminu, serotoninu nebo prostaglandinu E₂ ovlivňují fekunditu nebo mortalitu samic. Zatímco průměrný počet vajíček nakladených jednou samicí se od kontrol nelišil v žádné skupině, celková mortalita samic byla nižší ve skupině sající krev se serotoninem a mortalita nuliparních samic byla zvýšená u těch, které přijaly krev s histaminem.

Klíčová slova: *Phlebotomus argentipes*, *Mesocricetus auratus*, opakované sání na hostiteli, mortalita a fekundita flebotoma, biogenní aminy, prostaglandin.

ABSTRACT

The main aim of this thesis was to prove the hypothesis that the intake of blood with specific antibodies against sand fly saliva affects sand fly fecundity and mortality. *Phlebotomus argentipes* and *Mesocricetus auratus* were used for most experiments. ELISA revealed high levels of specific antibodies in repeatedly exposed hosts. However, a five-day study of mortality and fecundity of bloodfed females demonstrated that feeding on repeatedly bitten hamsters has no effect on number of eggs or survival of females.

Salivary antigens of *P. argentipes* recognized by sera of repeatedly bitten hamsters were characterized by immunoblotting and mass spectrometry. Immunoblotting showed that antibodies in the hamster sera recognize salivary proteins with molecular weight from 25 to 60 kDa. Mass spectrometry revealed that the antigens correspond to D7, apyrases, antigen 5 related proteins and yellow-related proteins.

In addition, *Phlebotomus* females were fed through a chicken membrane on rabbit blood with high concentrations of histamine, serotonin or prostaglandin E₂ to find out if they influence fecundity or mortality of sandfly females. While the approximate number of eggs layed by one female did not significantly differ from controls in any experimental group studied, the total mortality of females was lower in the group fed on blood with serotonin and the mortality of nulliparous females was increased in group fed on blood with histamine.

Key words: *Phlebotomus argentipes*, *Mesocricetus auratus*, repeated feeding on host, mortality and fecundity of a sandfly, biogenic amines, prostaglandine.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	<i>Phlebotomus argentipes</i>	2
2.2	Bioaktivní látky ve slinách flebotomů	2
2.3	Imunitní odpověď hostitele na hmyzí bodnutí	4
2.4	Vliv imunitní odpovědi hostitele na přenos patogenů vektorem.....	6
2.5	Vliv imunitní odpovědi hostitele na fitness, mortalitu a fekunditu krevsajících členovců	7
2.5.1	Vliv imunitní odpovědi hostitele na fitness, mortalitu a fekunditu klíšťat, hematofágních ploštic a komárů	7
2.5.2	Vliv imunitní odpovědi hostitele na fitness, mortalitu a fekunditu flebotomů	10
2.6	Vliv biogenních aminů a prostaglandinů na krevsající členovce	11
2.6.1	Histamin	11
2.6.2	Serotonin	12
2.6.3	Prostaglandin E ₂	13
3	METODIKA.....	15
3.1	Laboratorní zvířata	15
3.2	Sání flebotomů na imunizovaném hostiteli	15
3.2.1	Imunizace křečků	15
3.2.2	Sání <i>P. argentipes</i> na imunizovaných křečcích	16
3.2.3	Studium ovipozice a mortality	17
3.3	Odběr sér	18
3.4	Příprava antigenu ze slinných žláz <i>P. argentipes</i>	19
3.5	ELISA.....	19
3.6	SDS – PAGE elektroforéza	20
3.7	Hmotnostní spektrometrie	21
3.8	Imunoblot	23
3.9	Histologie tkání exponovaných flebotomům	24
3.9.1	Příprava histologických řezů	24
3.9.2	Barvení hematoxylin-eosin	24

3.9.3	Barvení toluidinovou modří	24
3.9.4	Montování preparátů	25
3.10	Membránové sání s biogenními aminy a prostaglandinem E ₂	25
3.11	Statistika a použité programy	26
4	VÝSLEDKY	27
4.1	Sání na imunizovaných křečcích a jeho efekt na fekunditu a mortalitu.....	27
4.2	Detekce specifických protilátek metodou ELISA	29
4.3	Identifikace hlavních antigenů ve slinách <i>P. argentipes</i>	30
4.4	Histologie tkání exponovaných flebotomům	32
4.5	Efekt sání s biogenními aminy a prostaglandinem E ₂	33
5	DISKUZE.....	39
6	SHRNUTÍ.....	44
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosin difosfát
AMP	adenosin monofosfát
ATP	adenosin trifosfát
CD	diferenciační skupina (z angl. cluster of differentiation)
DTH	hypersenzitivita oddáleného typu (z angl. delayed-type hypersensitivity)
ELISA	z angl. Enzyme-linked immunosorbent assay
GLM	z angl. General linearized models
HDC	z angl.. Higher-energy collisional dissociation
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
i. m.	z lat. injectio intramuscularis
kDa	kilodalton
LC/MS	z angl. liquid chromatography - mass spectrometry
LFQ	z angl. Label-free quantification
NCBI	z angl. National Center for Biotechnology Information
PGE	prostaglandin E
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (z angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
Th	z angl. T-helper
tHRF	z angl. tick histamine release factor
TNF	z angl. tumor necrosis factor
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organisation)

1 ÚVOD

Hematofágní hmyz narušuje sáním krve integritu organismu obratlovce. Poškozuje kůži, která je první obrannou linií organismu, a vstříkují do rány obsah svých slinných žláz. Slinné žlázy krevsajícího hmyzu obsahují proteiny a enzymy, které usnadňují příjem potravy a mírní hostitelovu imunitní odpověď. Hlavními funkcemi těchto slinných molekul jsou vasodilatace, narušení koagulace, zvýšení propustnosti kapilár, indukce exprese imunosupresivních cytokinů a vazba zánětlivých mediátorů. Vedlejším účinkem vstříknutých slin je také exacerbace některých infekcí, které hematofágní hmyz přenáší.

Imunitní systém hostitele rozpoznává slinné molekuly přenašeče a aktivuje uvolnění zánětlivých mediátorů. Tyto látky mají hostitele upozornit na poškození tkáně, slouží jako atraktans pro buňky imunitního systému a usnadňují jejich infiltraci. Při opakované expozici je buněčná i humorální odpověď hostitele rychlejší a výraznější díky paměťovým T-lymfocytům a specifickým protilátkám. Zatímco IgE protilátky vznikají pouze u některých hostitelů, IgG protilátky se tvoří u všech imunokompetentních jedinců.

Cílem této diplomové práce bylo především ověřit hypotézu, že protilátková odpověď křečků opakovaně pobodaných flebotomy druhu *Phlebotomus argentipes* má vliv na mortalitu a fekunditu samic flebotomů. Dále jsme chtěli zjistit, zda obdobný vliv má i příjem krve se zvýšenou koncentrací histaminu, serotoninu nebo prostaglandinu E₂. Dalšími cíly byly i identifikace hlavních slinných proteinů flebotoma *P. argentipes* pomocí hmotnostní spektrometrie a studium histologických změn v ušních boltcích pobodaných křečků.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 *Phlebotomus argentipes*

Phlebotomus argentipes je menší a tmavě zbarvený druh flebotoma z podrodu *Euphlebotomus*. Je rozšířen především na Indickém poloostrově, kde je hlavním přenašečem *Leishmania donovani*, původce viscerální leishmaniózy. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) se v Indii vyskytuje 50% všech případů tohoto onemocnění, celosvětová incidence se pohybuje v řádech set tisíců případů a v riziku žije přibližně 200 miliónů lidí (Stauch a kol., 2011). Neléčené onemocnění dosahuje až 90% úmrtnosti. Podstatná část infekcí probíhá dlouhou dobu subklinicky (shrnutí v Bora, 1999) a bez sérologických či molekulárních testů je tak včasná diagnóza téměř nemožná.

Viscerální leishmanióza se na Indickém poloostrově vyskytuje ve formě antroponózy. Bezpríznakový průběh a často nedostupná léčba činí z člověka ideální rezervoár infekce. Přenos umožňuje i synantropní způsob života *P. argentipes*. Larvy se líhnou nejen ve vlhké půdě kontaminované organickými zbytky, ale často přímo ve stájích a lidských obydlích (Chowdhury a kol., 2016). Vylíhlí dospělci tak mají v okamžiku, kdy jsou připraveni sát, k dispozici své budoucí hostitele. Těmi jsou lidé a hospodářská zvířata (Kumar a kol., 2015), na nichž flebotomus sají i přímo uvnitř příbytků (Dinesh a kol., 2001). Nerušený příjem krve flebotomům umožňují imunomodulační a antihemostatické vlastnosti slin.

2.2 Bioaktivní látky ve slinách flebotomů

Látky obsažené ve slinách flebotomů, zpravidla proteiny, peptidy či nukleosidy, inhibují hemostatické i imunitní reakce, k nimž dochází v místě vpichu. Současně však některé z nich účinkují jako silné antigeny schopné vyvolat tvorbu specifických protilátek a buněčnou odpověď.

Spektrum slinných molekul není napříč všemi druhy flebotomů stejné (shrnutí v Gomes a Oliveira, 2012). Dobrým příkladem rozdílného složení slin je koncentrace adenosinu, který se ve slinách *P. argentipes* a *Phlebotomus papatasi* vyskytuje ve velkém množství a u *Lutzomyia longipalpis* či *Phlebotomus duboscqi* nebyl zjištěn (shrnutí v Gomes a Oliveira, 2012). Nejinak je tomu i u první popsané molekuly s imunomodulačními a vasodilatačními schopnostmi ze slin flebotomů – maxadilanu. Ten se naopak vyskytuje pouze u přenašečů

leishmanií v Novém světě, flebotomů rodu *Lutzomyia* (Lerner a kol., 1991). Rozšířením kapilár a inhibicí koagulace napomáhá příjmu krve také adenosin (Ribeiro a kol., 1989; Ribeiro a Modi, 2001). Tento nukleosid též moduluje imunitní odpověď hostitele, podporuje produkci Th2 cytokinů, a naopak tlumí Th1 odpověď ve formě TNF- α a IL-12 (Haskó a kol., 1996). Navozením lokální imunosuprese připravuje adenosin vhodné prostředí i pro exacerbaci leishmaniózy (viz dále).

Sliny *P. argentipes* dosahují kompletního proteinového složení pátý den po vylíhnutí z kukly a pomocí imunoblotingu v nich křeččí protilátky rozpoznaly celkem dvacet proteinů (Martín-Martín a kol., 2013). Z nich bylo různými autory identifikováno asi 15: apyráza, antigen 5-related protein, PpSP32-like protein, D7-related protein, protein neznámé funkce o velikosti 33 kDa (Anderson a kol., 2006; Martín-Martín a kol., 2013), protein podobný endonukleáze (Anderson a kol., 2006) tři až pět PpSP15-like proteinů, a dva proteiny nezařazené do žádné rodiny (Anderson a kol., 2006; Martín-Martín a kol., 2013).

Enzymy jsou důležitou složkou slin usnadňující flebotomům příjem krve. Jedním z nich je endonukleáza (shrnutí ve Vlková a kol., 2014). Vznik potravní léze podporuje hyaluronidáza, která byla zaznamenána i u *P. argentipes* (Rohoušová a kol., 2012). Shlukování krevních destiček brání, podobně jako u jiných krevsajících bezobratlých (Ribeiro a kol., 1984), enzym apyráza, která hydrolyzuje ADP a ATP na AMP (Ribeiro a kol., 1989).

Jednou z hlavních imunogenních molekul ve slinách flebotů jsou antigen 5-related proteiny. Antigen 5 byl popsán jako hlavní alergen v jedu blanokřídlých (King a kol., 1987), ale podobné proteiny se vyskytují u všech druhů flebotomů a dalšího krevsajícího hmyzu (Rohoušová a kol., 2012). Ačkoli jejich funkce nejsou zcela objasněné, vyvolávají u hostitele buněčnou a protilátkovou odpověď (Vlková a kol., 2011).

Dalšími vysoce imunogenními skupinami proteinů jsou PpSP15-like a D7 proteiny, které se společně řadí do rodiny proteinů vázajících odoranty. Díky schopnosti těchto proteinů navodit pozdní hypersenzitivní reakci u myši byly PpSP15-like proteiny považovány za vhodné kandidáty na vakcínu, která by chránila před *Leishmanií major* (Valenzuela a kol., 2001). Ačkoli jejich funkce není zcela známá, PpSP15-like proteiny byly nalezeny pouze u flebotomů (Anderson a kol., 2006). D7 proteiny nesou název podle podobnosti s D7 proteinem ze samice *Aedes aegypti* (James a kol., 1991). Kromě všech doposud studovaných flebotomů je lze najít i u jiného krevsajícího hmyzu (Rohoušová a kol., 2012). D7 proteiny jsou hematofágním hmyzem využívány především k neenzymatické vazbě agonistů hemostáze a zánětu, jako jsou histamin, serotonin či ADP, které bolestí a svěděním hostitele upozorní na vznikající zánět a tím ohrožují úspěšné sání flebotoma (Šíma a kol., 2016). O významném zastoupení proteinů D7

ve slinném proteomu nasvědčuje, že tvoří celých 10 – 50% slinných proteinů a patří k nejčastěji detekovaným proteinům ve slinách krevsajícího hmyzu (Valenzuela a kol., 2002).

Biogenní aminy jsou u flebotomů vázány také yellow-related proteiny. U *L. longipalpis* bylo popsáno, že se LJM11, LJM111, a LJM17 liší svojí afinitou ke katecholaminům, serotoninu a histaminu (Xu a kol., 2011). Na základě vytvořené 3D struktury yellow-related proteinu z *L. longipalpis* byly sestaveny další 3D modely těchto proteinů u dalších třinácti druhů flebotomů (Šíma a kol., 2016). Tyto proteiny patří, podobně jako D7, mezi hlavní antigeny ve slinách flebotomů, a v rekombinantní podobě mohou sloužit k detekci markerů expozice či pobodání (Teixeira a kol., 2010). Sliny *P. argentipes* obsahují pouze jeden yellow-related protein (Anderson a kol., 2006).

2.3 Imunitní odpověď hostitele na hmyzí bodnutí

Reakce na sliny, které flebotomus do hostitele injikuje, závisí na druhu hostitele, ale může být ovlivněna i dalšími faktory, například věkem a dřívější expozicí flebotomům nebo jinému krevsajícímu dvoukřídlelému hmyzu. Do obrany proti cizorodým látkám a poškození tkáně jsou zapojeny mechanismy vrozené i adaptivní imunity. Její schéma u člověka bylo detailně popsáno u *Ae. aegypti*. V tomto procesu počínajícím iniciací a končící desenzibilizací bez jakékoli kožní a systémové reakce se postupně objevují fáze s pozdní hypersenzitivní reakcí, časnou i pozdní hypersenzitivní reakcí a se samotnou časnou hypersenzitivní reakcí (Killby a Silverman, 1967).

První kožní imunitní odpověď na bodnutí flebotoma je hypersenzitivní reakce IV. typu. Je založená na buněčné odpovědi, která nastává poté, co jsou antigeny vstříknuté do hostitele se slinami flebotoma prezentovány T-lymfocytům. Prodleva mezi vstupem antigenu do organismu a vznikem kožní reakce je způsobena dobou, kterou potřebují imunitní buňky k migraci do místa zánětu. U senzibilizovaných osob se v případě pobodání *P. papatasi* objevily typické svědivé, vytrvalé léze 6 - 8 hodin po sání, u jedinců naivních o něco později. Kromě zarudnutí byl v exponovaných částech těla pozorován zvýšený průtok krve a infiltrace lymfocytů, neutrofilů, makrofágů a dendritických buněk (Belkaid a kol., 2000b). Během dalšího pozorování na myších bylo zjištěno, že preexponované myši zapojily do obrany organismu v místě vpichu výrazně vyšší počet neutrofilů než myši naivní. Množství se vrátilo do normálních hodnot teprve po týdnu od sání (Teixeira a kol., 2014).

Pro migraci neutrofilů a vznik zánětu jsou důležité mastocyty. Jejich degranulace je způsobena interakcí s infiltrovanými T-lymfocyty (Biedermann a kol., 2000). Degranulací

mastocytů se do poraněné tkáně vylévají histamin, serotonin a heparin, jejichž hlavní úloha tkví ve zvýšení propustnosti kapilár a průtoku krve. Stimulací nervových zakončení v kůži přispívají histamin a serotonin také ke svědění v místě vpichu. K těmto projevům včetně bolesti napomáhají také sekreční produkty neutrofilů, jako jsou leukotrieny či prostaglandiny. O tom, že v imunopatologické reakci oddáleného typu hrají hlavní efektorovou roli $CD4^+$ T-lymfocyty, svědčí fakt, že se u myši bez tohoto typu buněk razantně snížila infiltrace makrofágů a eozinofilů do dermis (Belkaid a kol., 2000b). Tato skupina lymfocytů indukuje především sekreci $IFN-\gamma$ aktivujícího makrofágy a dalších zánětlivých cytokinů, zatímco role paměťových $CD8^+$ T-buněk spočívá spíše v produkci IL-10, IL-4 a směřování odpovědi k Th2 (Marzouki a kol., 2011).

U lidí opakovaně pobodaných flebotomy, zejména dětí s výjimkou novorozenců, se vyskytuje forma pozdní hypersenzitivní reakce známá jako „harara“. Tato kopřivka (*urticaria multiformis endemica*) se projevuje perzistujícími papulami, které se mohou objevit nejen v okolí vpichu, ale i difúzně po celém těle (Raza a kol., 2008).

Při opakované expozici slinám flebotomů také vznikají specifické protilátky IgG, IgM a IgE (Valenzuela a kol., 2001; Hostomská a kol., 2008; Martín-Martín a kol., 2015). Zatímco hladiny IgE a IgM jsou značně individuálně variabilní, IgG protilátky by mohly sloužit jako účinný marker expozice flebotomům (Hostomská a kol., 2008; Martín-Martín a kol., 2015). Tento způsob využití humorální imunity ale komplikuje fakt, že IgG protilátky někdy zkříženě reagují mezi různými druhy flebotomů. Příkladem jsou IgG proti slinám *P. argentipes* reagující částečně zkříženě se slinami *P. papatasi*. Navíc, využití protilátek jako markeru expozice může při epidemiologických studiích komplikovat jejich poměrně dlouhý poločas rozpadu, který byl u IgG proti slinám *P. argentipes* spočten na 5,5 měsíce (Clements a kol., 2010).

Časná hypersenzitivní reakce je vázána zejména na žírné buňky a specifický imunoglobulin třídy E. V místě hmyzího bodnutí vzniká během minut papulární léze, která zmizí za několik hodin. Prvními aktivovanými buňkami jsou v tomto případě mastocyty, které po navázání IgE s antigenem degranulují. Tím upozorní hostitele bolestí a svěděním na parazita a současně vyloučí do okolí porušené tkáně chemotaktické faktory pro další buňky. Větší propustnost kapilár má za následek edém pozorovatelný v dermis. Tento jev je spojen s infiltrací polymorfonukleárních leukocytů (Demeure a kol., 2005), ale pouze velmi malým množstvím eosinofilních granulocytů. Lymfocyty se do této reakce takřka nezapojují (Li a Reed, 1984). Je zřejmé, že vznik IgE protilátek je u psů zcela individuální a u mnoha jedinců vůbec nemusí nastat (Hostomská a kol., 2008).

Okamžitá reakce, pozdní hypersenzitivní reakce, desenzibilizace, ani anafylaxe při bodnutí *P. argentipes* doposud nebyly popsány.

2.4 Vliv imunitní odpovědi hostitele na přenos patogenů vektorem

Sliny jsou u hematofágního hmyzu důležité pro příjem krve, neboť mají antihemostatické účinky. Sliny mají však i imunomodulační vlastnosti a ty mohou být zásadní pro úspěšný přenos patogenů. U imunologicky naivních hostitelů, tedy těch, kteří nemají vytvořenou imunitní odpověď proti slinám přenašeče, sliny snižují infekční dávku patogenů a zvyšují jejich virulenci. Zároveň je však známo, že opakovaná expozice neinfikovaným vektorům poskytuje hostiteli ochranu před nákazou patogenem přenášeným tím samým druhem vektora (shrnuť v Ockenfels a kol., 2014). Získaná imunita proti slinám vektora tak hostitele chrání například před nákazou *Plasmodium yoelli* při předchozí expozici komároví *A. stephensi*. Stejný model funguje také u komára *Ae. aegypti* a viru Chikungunya nebo u klíštěte *Ixodes scapularis* a bakterie *Borrelia burgdorferi* (Donovan a kol., 2007; Thangamani a kol., 2010; Wikel a kol., 1997). Zřejmě nejširší poznatky v této oblasti však byly získány o přenosu leishmanií flebotomem.

V časně fázi infekce leishmanie těží především z chemotaktických vlastností slin, které do místa vpichu u naivního hostitele přivádějí neutrofily a makrofágy (Teixeira a kol., 2005). Neutrofily zprostředkují infekci makrofágů na principu trojského koně. Poté, co leishmanii pohltní, začne parazit indukovat expresi chemotaktického faktoru pro makrofágy a oddalovat apoptózu neutrofilů. Ačkoli se leishmanie v neutrofilech nedělí, dokáže v nich přežít. Když infikovaný neutrofil začne exprimovat apoptické signály, je pohlcen makrofágem. Takto se leishmanie dostává do své cílové hostitelské buňky (van Zandbergen a kol., 2004).

Doposud nejlépe byl prostudován vliv slin flebotoma na exacerbaci kožní leishmaniózy u naivního hostitele na hlodavčím modelu. Poprvé byl tento jev popsán před necelými třiceti lety (Titus a Ribeiro, 1988) a právě větší léze vznikající u hostitele, kterému byly leishmanie inokulovány spolu se slinami, mu přinesly název „enhancing effect“ (Belkaid a kol., 1998). Schopnost slin zvětšit leishmaniovou lézi je vysvětlován tím, že přesměřují původní zánětlivou Th1 odpověď k Th2 (shrnuť v Rohoušová a Volf, 2006). Snížená exprese zánětlivých cytokinů, jako jsou IFN- γ či IL-12 a vyšší produkce tlumivých IL-4 a IL-10 podporuje diferenciaci regulačních T-lymfocytů (shrnuť v Ockenfels a kol., 2014). Dalším mechanismem vedoucím k utlumení obrany proti leishmaniím jsou inhibice prezentace

antigenů makrofágy (Theodos a Titus, 1993) a indukce produkce prostaglandinu E₂ těmito buňkami (Carregaro a kol., 2008).

Specifická humorální a buněčná odpověď vyvolaná opakovanou expozicí slinným antigenům flebotomů způsobuje, že enhancing effect slin pozbývá účinku (Belkaid a kol., 1998). Ať již byla zvířata imunizována slinami či sáním neinfekčních *P. papatasi*, léze způsobené *L. major* byly menší a trvaly kratší dobu oproti lézím u myši kontrolních (Belkaid a kol., 1998; Kamhawi a kol., 2000). V místě inokulace slin a leishmanií byl také pozorován nižší počet parazitů. Experimentální nákazy hlodavců potvrdily, že se na ochraně proti leishmanióze podílí spíše okamžitá buněčná imunitní reakce společně s DTH a nikoli neutralizující protilátky. Proti *L. major* byly po imunizaci PpSP15 ze slin *P. papatasi* chráněny jak imunokompetentní myši, tak jedinci postrádající B-lymfocyty (Valenzuela a kol., 2001).

V místě inokulace hraje u imunních hostitelů rozhodující roli včasná aktivace makrofágů společně s cytotoxickou aktivitou buněk založenou na IFN- γ a IL-12. Prozánětlivé cytokiny v odpovědi imunizovaného hostitele obecně převládají nad těmi regulačními, jako jsou IL-4 a IL-10, a dochází k časnější aktivaci leukocytů (Teixeira a kol., 2014). To má za následek převážení Th1 imunitní reakce a efektivnější likvidaci leishmanií. Tento jev byl nezávisle popsán u několika flebotomů. Zatím jedinou dosud známou výjimku představuje přenos experimentální infekce *L. brasiliensis* flebotomem *L. intermedia*; myši imunizované extraktem ze slinných žláz *L. intermedia* exprimovaly více Th2 cytokinů, což podpořilo exacerbaci leishmaniózy (de Moura a kol., 2010).

2.5 Vliv imunitní odpovědi hostitele na fitness, mortalitu a fekunditu krevsajících členovců

2.5.1 Vliv imunitní odpovědi hostitele na fitness, mortalitu a fekunditu klíšťat, hematofágních ploštic a komárů

Vliv specifické imunitní odpovědi hostitele na sání ektoparazita byl pozorován u různých skupin krevsajícího hmyzu i u klíšťat.

Klíšťata čeledi Ixodidae tráví na hostiteli dny až týdny, než přijmou dostatečný objem krve, a jsou proto s jeho imunitním systémem v kontaktu výrazně déle, než krevsající hmyz. Zřejmě nejvíc poznatků o tom, jakým způsobem imunitní odpověď hostitele dokáže ovlivnit fitness vektora, bylo získáno u klíštěte *Boophilus microplus*, které působí vážné ztráty v chovech skotu přenosem protozoárního parazita *Babesia bovis* a *Anaplasma marginale*.

V pokusech tato klíšťata sála na skotu imunizovaném extraktem z celých dospělců *B. microplus*. Larvy klíšťat nebyly imunitní odpovědí zasažené. Pouze u některých hostitelů se objevily hypersenzitivní reakce, které způsobily odvržení larev. Svlékání těch larev, které se nasály, se pouze zpozdilo o dvanáct hodin. Mortalita dospělců se však zvýšila o 60%, neboť dospělci často měli perforované střevo a nebyli schopni strávit přijatou krev. Ty samice, kterým se podařilo proces trávení dokončit, zpravidla uhynuly ještě před naklazením vajíček (Willadsen a kol., 1992; Kemp a kol., 1986).

Poznatky o vlivu specifických protilátek hostitele na fitness *B. microplus* vedly k výrobě vakcíny založené na rekombinantním BM86. Glykoprotein BM86 se vyskytuje na vnitřní straně stěny střeva klíštěte a jeho funkce zůstává doposud nejasnou. Vakcína se stala komerčně dostupnou na počátku 90. let 20. století pod názvem TickGARD v Austrálii a GAVAC v Jižní Americe. Vakcinace tímto proteinem snižuje infestaci skotu klíšťaty a tím přenos patogenů, ale také fertilitu samic (shrnutí v Merino a kol., 2013).

Snížená ovipozice byla pozorována také u samic klíšťáků (čeleď Argasidae), například u klíšťáka *Ornithodoros moubata*, přenašeče návratných horeček a viru africké prasečí horečky. Klíšťáci sáli na králících imunizovaných opakovaným sáním nebo purifikovaným vaječným proteinem klíšťat, vitellinem. Ačkoli se nelišilo množství přijaté krve klíšťaty v kontrolní ani experimentální skupině, byla u samic sajících na imunizovaném králíkovi pozorována výrazně delší doba ovipozice a také došlo ke snížení počtu nakladených vajec (Chinzei a Minoura, 1988).

O specifitě adaptivní imunity hostitele při opakované infestaci klíšťaty svědčí pokusy s *Rhipicephalus sanguineus*. Toto klíště se vyskytuje především v subtropických a tropických oblastech světa a přenáší parazity rodu *Babesia* a *Theileria*, dále rickettsie, *Anaplasma* a *Coxiella* a borrelie (*Borrelia duttoni*). V pokusech sála klíšťata na psech imunizovaných buď slinnými žlázami, nebo extraktem ze střeva, anebo expozicí *R. sanguineus*. Zatímco největší vliv na fekunditu měla imunizace extraktem ze střeva, negativní dopad na dobu potřebnou k nasátí a objem přijaté krve byl nejvýraznější u psů imunizovaných extraktem ze slinných žláz. Negativní vliv se projevil po třetím sání, ale po páté expozici se příjem krve i ovipozice vrátili do „normy“ (Jittapalapong a kol., 1999). Podobný výsledek byl zaznamenán v pokusech s klíštětem *Amblyomma hebraeum* sajícím na ovcích, kdy měla opakovaná expozice za následek pouze dočasný pokles úspěšnosti v příjmu krve klíšťaty (Norval a kol., 1988).

Pokusy s opakovanou expozicí byly prováděny také u různých skupin hmyzu. Ploštice z čeledi Reduviidae (podčeleď Triatominae, přenašeči Chagasovy choroby) na hostiteli nesají tak dlouhou dobu jako klíšťata, k plnému nasátí až mililitru krve potřebují zpravidla desítky

minut a jsou náchylné k vyrušení od příjmu potravy. Larvy a dospělci *Rhodnius prolixus*, sály na myších imunizovaných opakovanou expozicí. Čas, který ploštice potřebovaly k plnému nasání, byl kratší u těch, které sály na opakovaně exponovaných myších. Přesto samice, které sály na imunizovaném hostiteli, nakladly zhruba poloviční počet vajíček, než ty, kterým byl nabídnut naivní hlodavec (Krinsky, 1985). Ačkoli se zdá, že z hlediska fekundity je pro krevsající ploštice vhodnějším zdrojem potravy hostitel nevytvářející specifickou odpověď vůči jejich slinám, *Triatoma infestans* preferovala v experimentu imunizované kuře s vysokými titry protilátek a kožními reakcemi na bodnutí před kuřetem naivním, přičemž k plnému nasátí jí na prvním z hostitelů stačil poloviční čas. Stejně tak se u triatom sajících na imunizovaném hostiteli zkrátila doba potřebná k vývoji v dospělé. Autoři Hecht a kol. (2006) ale pro toto překvapivé zjištění neposkytli žádné vysvětlení.

Podstatně menší množství krve (řádově mikrolitry) a kratší čas (minuty) potřebují k plnému nasátí komáři. U komára rodu *Anopheles* byla sledována fekundita, mortalita a ovipozice poté, co samice sály na imunizovaných králících. V prvním pokusu byli králíci imunizováni hemolymfou *A. stephensi*. Imunizace neměla vliv na příjem krve komárem, ale samice začaly klást vajíčka později a jejich fekundita i životaschopnost se snížily v porovnání se samicemi sajícími na naivním hostiteli (Gulia a kol., 2002). V dalším experimentu byl králík imunizován tkáněmi *A. tessellatus*. Opět došlo ke snížení počtu nakladených vajec, ale mortalita samic nebyla změněna. Opačná situace nastala u komára *Culex quinquefasciatus*, který je známý jako vektor *Wuchereria bancrofti*, ptačí malárie a arbovirů. Samice sající na králíkovi imunizovaném tkáněmi *C. quinquefasciatus* hůře přežívaly, avšak jejich fekundita se nelišila od kontrol (Ramasamy a kol., 1992).

O diskutabilním vlivu specifické imunitní odpovědi hostitele na mortalitu komárů svědčí dva pokusy s *Ae. aegypti*, který je typickým přenašečem horečky Dengue a žluté zimnice. Zatímco mortalita komárů sajících na myších pozitivně korelovala se zvýšeným titrem jejich specifických imunoglobulinů, sání na imunizovaném králíkovi úmrtnost samic komárů nijak neovlivnilo. V obou studiích se také liší výsledky týkající se vlivu imunitní odpovědi hostitele na fekunditu. Samice, které přijaly králíčí krev s protilátkami, nakladly v porovnání s kontrolou méně vajec, zatímco plodnost komárů sajících na myši se nezměnila (Ramasamy a kol., 1988; Hatfield, 1988).

2.5.2 Vliv imunitní odpovědi hostitele na fitness, mortalitu a fekunditu flebotomů

Dosavadní znalosti o efektu imunitní odpovědi hostitele na flebotomy jsou rozporuplné, možná i proto, že byly získány různými laboratořemi na různých dvojicích flebotomus - hostitel.

Ve starší studii s *Phlebotomus duboscqi* byla první skupina křečků imunizovaná homogenátem ze střeva flebotomů a druhá homogenátem z celého těla. Samice, které sály na obou imunizovaných skupinách hynuly dříve a kladly méně vajec než samice kontrolní (Ingonga a kol., 1996). V novější studii sál *P. duboscqi* na křečcích imunizovaných opakovanou expozicí a kromě mortality a fekundity bylo porovnáváno, za kolik dní samice nakladly vejce a za kolik dní se z vajec vylíhly larvy. Všechny rozdíly mezi experimentální a kontrolní skupinou byly statisticky bezvýznamné (Kaburi a kol., 2011).

U druhu *Phlebotomus perniciosus* nebyl pozorován vztah mezi zvýšenou hladinou IgG protilátek a mortalitou u samic sajících opakovaně na stejné myši (Martín-Martín a kol., 2015). Oproti tomu u *Lutzomyia longipalpis* sání na králících imunizovaných střevem nebo slinami flebotoma mělo za následek pokles fekundity a vzestup mortality. Autoři předpokládají, že za tento efekt jsou zodpovědné protilátky proti slinám nebo střevu (Vilela a kol., 2006). Experimenty *in vivo* i *in vitro* ukázaly, že protilátky proti slinnému peptidu maxadilanu blokují jeho vasodilatační funkci a částečně inaktivují inhibitor komplementu (Cavalcante a kol., 2003; Milleron a kol., 2004), což má za následek menší množství přijaté krve samicemi a nižší ovipozici. Tyto protilátky jsou specifické jak pro rod flebotoma, tak pro variantu maxadilanu. Specifita imunoglobulinů byla ověřena experimentálním sáním *Phlebotomus papatasi* na myších imunizovaných maxadilánem. Protože *P. papatasi* maxadilán ve svých slinných žlázách nemá, neměla na něj tato imunizace žádný vliv (Milleron a kol., 2004).

P. papatasi je známý schopností vyvolat u lidí při opakované expozici silnou pozdní hypersenzitivní reakci. Na hostiteli s touto reakcí se flebotomus dokáže nasát téměř dvakrát rychleji oproti kontrole, což je způsobeno vyšším přítokem krve do místa sání. Je proto možné, že *P. papatasi* indukuje vznik delayed-type hypersenzitivity ve svůj vlastní prospěch (Belkaid a kol., 2000a). S tímto druhem flebotoma byl též prováděn pokus s protilátkami, a to imunoglobuliny specifickými pro PpChit1 - chitinázu ve střevě *P. papatasi*. Protilátky proti ní snižují její chitinolytickou aktivitu (Ramalho-Ortigão a kol., 2005). Samice, které sály krev s těmito protilátkami, začaly klást o den později, což autoři vysvětlují zhoršenou schopností přijímat živiny kvůli změnám v peritrofitické matrix. Tyto samice však žily déle než kontrolní skupina (Robles-Murguía a kol., 2014).

Při péči o laboratorní chov *Phlebotomus argentipes* častěji hynuly samice, které sály vícekrát na téže křečkoví (Ghosh a Mukhopadhyay, 1998). Proto byl těmito autory uskutečněn pokus, ve kterém byli křečci opakovaně exponováni 90 až 150 samicím *P. argentipes*. Během prvních pěti sání se neobjevil signifikantní rozdíl mezi počtem samic, které přijaly krev, v experimentální a kontrolní skupině. Stejně tak se nelišila jejich mortalita před naklazením vajíček. S přibývajícím počtem opakování se ale v experimentální skupině množství samic sajících na křečkoví signifikantně snížilo a mortalita nuliparních samic se naopak téměř ztrojnásobila. V dalším experimentu byli křečci nahrazeni kuřecí membránou, přes kterou byla flebotomům nabídnuta inaktivovaná králičí krev se sérem z naivního křečka v kontrolní a z imunizovaného křečka v experimentální skupině. Ačkoli se počet nasátých samic nelišil, do sedmého dne byla zaznamenána vyšší mortalita u těch, které přijaly krev s imunním sérem. Výsledky pokusů autoři považují za důsledek působení protilátek, které narušují normální fyziologické procesy flebotoma a jsou namířeny proti druhově specifickému epitopu ve slinných žlázách *P. argentipes* (Ghosh a Mukhopadhyay, 1998).

2.6 Vliv biogenních aminů a prostaglandinů na krevsající členovce

Biogenní aminy jsou, společně s prostaglandiny, nedílnou součástí mechanismů důležitých pro udržení integrity organismu a zapojují se do jeho obrany při poškození tkání a zánětu. Ačkoli se liší jejich zastoupení i konkrétní funkce u různých druhů organismů, nalézáme je u bezobratlých i u obratlovců.

2.6.1 Histamin

Histamin se vyskytuje u všech obratlovců. Ve tkáních trávicí soustavy, kůži, kosterní svalovině, plicích, peritoneu, nervové soustavě (a u kostnatých ryb také v plynovém měchýři) je uložen v granulech žírných buněk, zatímco v krvi jej uchovávají bazofilní granulocyty. V krvi zdravého člověka se histamin vyskytuje volně v krvi v koncentraci 25 – 65 ng/ml (Jackson a kol., 1998). K jeho uvolnění v savčím organismu může přispět řada fyzických i chemických agens. Typické je vylití granulí s histaminem během počáteční fáze zánětu nebo v hypersenzitivní reakci prvního typu, kde bývá tento jev často spjatý s imunoglobuliny třídy E (shrnutí v Reite, 1972). Uvolněný histamin se váže na některý ze čtyř specifických receptorů na buňkách v místě účinku (hladké svaly, endoteliální buňky, parietální buňky v trávicí

soustavě, centrální nervový systém, mastocyty, eosinofily, T-lymfocyty, dendritické buňky) a působí na fyziologické funkce organismu, jako jsou krevní tlak, sekrece tekutin v dýchací i trávicí soustavě nebo růst a obnova tkání. Působením na kapiláry vyvolává histamin jejich dilataci a zvyšuje permeabilitu, zatímco u hladké svaloviny, jako například ve střevě nebo v průduškách, naopak působí konstriktci (shrnutí v Shahid a kol., 2009).

U bezobratlých je histamin velmi často zapojen do mechanismů obrany či útoku, byl nalezen například ve vosím i včelím jedu (shrnutí v Reite, 1972). U klíšťat je situace jiná. Zatímco na počátku histamin narušuje jejich sání a proto jej vyvazují pomocí lipokalinů (shrnutí v Andersen, 2010), po několika dnech tato vnímavost k histaminu vymizí a naopak sající klíšťata indukují jeho uvolnění pomocí tick histamine release faktoru (tHRF). Tento protein se váže na hostitelovy bazofily a indukuje uvolnění granulí s histaminem, což v případě *I. scapularis* kromě napomáhá nejen sání, ale také přenosu *B. burgdorferi* (Kemp a Bourne, 1980; Dai a kol., 2010; Mulenga a Azad, 2005).

Účinku histaminu působícího hostiteli svědění se snaží vyhnout také ploštice a zřejmě i další krevsající hmyz. Bylo prokázáno, že sliny *Rhodnius prolixus* aktivitu histaminu inhibují (shrnutí v Ribeiro, 1982) a že ploštice mají, podobně jako klíšťata, ve slinách lipokalinu vázající biogenní aminy. Ačkoli v hlavě komára *Culex pipiens* byly bezprostředně po příjmu krve naměřeny vyšší koncentrace histaminu, tito dvoukřídlí se jej snaží také eliminovat, a to především pomocí D7 proteinů (Mans a kol., 2007). Přestože okamžité hypersenzitivní reakce vyvolané bodnutím komára jsou zcela běžné, zdá se, že histamin v tomto případě není hlavním mediátorem způsobujícím hostiteli svědění. Přinejmenším tomu nasvědčují pokusy, v nichž se u senzibilizovaných myší objevil pruritus po pobodání *Ae. albopictus* i přes to, že k experimentu byly použity myši WBB6F1-W/Wv, které postrádaly funkční mastocyty (Ohtsuka a kol., 2001).

2.6.2 Serotonin

Serotonin je 5-hydroxytryptamin, monoamin odvozený od tryptofanu, který účinkuje jako neurotransmitter centrálním nervovým systémem a jako neurohormon, pokud je uvolněn do krevního oběhu. Jedná se o nejstarší signální molekulu v evoluci, a proto není divu, že ji lze nalézt v obratlovcích organismech, u bezobratlých živočichů, ale také v houbách či rostlinách (shrnutí ve Vleugels a kol., 2015). U savců jsou jeho účinky zprostředkované specifickými receptory a ovlivňují především kontrakce hladkého svalstva, náladu, chování, spánkové cykly a chuť k jídlu. Serotonin je v centrální nervové soustavě obratlovců

syntetizován a skladován v presynaptických neuronech. Mimo ni představují největší „úložiště“ serotoninu krevní destičky, které jej vychytávají z krevní plasmy (shrnutí v Mohammad-Zadeh a kol., 2008). Z trombocytů pak je uvolňován během srážení krve (hemokoagulace). Volně v séru se serotonin vyskytuje jen ve velmi malém množství, konkrétně u lidských sér 101 – 283 ng/ml (Landau a kol., 2016). Mnohé tkáně jsou ale na serotonin poměrně bohaté, jako například mozek, plíce, ledviny a trávicí trakt (Humphrey a Jaques, 1954; shrnutí v Tyce, 1990). U lidí a myši je serotonin také obsažen v sekrečních granulích žírných buněk, která jsou uvolňována během zánětu či hypersenzitivní reakce (Ringvall a kol., 2008).

Zastoupení histaminu a serotoninu jako mediátorů zánětu se u různých druhů savců liší. Proto jsou klíšťata sající na druzích, jako jsou myšovití hlodavci, vybavena lipokaliny vykazujícími vyšší afinitu k serotoninu než k histaminu, zatímco lipokaliny klíšťat preferujících skot vyvazují lépe histamin (Sangamnatdej a kol., 2002).

Ploštice čeledi Reduviidae serotonin využívají, podobně jako savci, jako neuromodulátor, případně neurohormon. Svědčí o tom jeho výskyt v nadjícnovém, podjícnovém a hrudním gangliu *T. infestans* a koncentrace v hemolymfě měnící se podle příjmu potravy u *R. prolixus* (Settembrini a Villar, 2004; Lange a kol., 1989). Souvislost serotoninu s příjmem potravy *R. prolixus* a *T. infestans* ukazuje jeho stimulační působení na kontrakce aorty, cirkulaci hemolymfy a diurézu (Lange a kol., 1988; Villalobos-Sambucaro a kol., 2015).

Ačkoli komáři vyvazují hostitelův serotonin (podobně jako histamin) především pomocí D7 proteinů, je jejich vlastní 5-hydroxytryptamin zcela nepostradatelný. Jako neurotransmitter působí serotonin i u komára *A. gambiae*, u něž podání serotoninu zrychluje spolu s glutamátem frekvenci srdečních kontrakcí (Hillyer a kol., 2015). U *Ae. aegypti* obklopují serotonin-imunoreaktivní axony nervů slinné žlázy dospělých samic. Tato lokalizace umožňuje přímé působení na sekreci slin, a tím i na úspěšný příjem potravy (shrnutí ve Vleugels a kol., 2015).

2.6.3 Prostaglandin E₂

Ve výčtu biologicky aktivních látek působících v zánětlivé reakci nelze opomenout nejrozšířenější prostaglandin v živočišné říši, prostaglandin E₂. Prostaglandiny jsou, stejně jako tromboxan A₂, molekuly odvozené od kyseliny arachidonové a hrají důležitou roli v hemostázi (shrnutí v Sugimoto a Narumiya, 2007).

Navázáním se na specifické receptory indukuje prostaglandin E₂ u savců řadu funkcí v trávicím traktu v cévní a pohlavní soustavě. Poněkud ambivalentní roli zastává prostaglandin

E₂ v imunitním systému. V akutní fázi zánětu vyvolává zarudnutí a otok zvýšením permeability stěn kapilár, a jejich dilatací a působením na senzorické neurony, také bolest (shrnutí v Ricciotti a Fitzgerald, 2011). Současně ale inhibuje sekreci zánětlivých cytokinů, jako jsou IL-2 a IFN- γ , a tím napomáhá diferenciaci Th2 imunitní odpovědi (Betz a Fox, 1991). V séru zdravého člověka se prostaglandin E₂ vyskytuje v koncentraci 0,72 ng/ml (D'Eufemia a kol., 2008).

O tom, že klíšťata během příjmu krve těží z těchto imunosupresivních vlastností, svědčí například skutečnost, že *Boophilus microplus* vyprodukuje do místa sání až 1,8 ng prostaglandinu E₂ (Inokuma a kol., 1994). Látka má však u klíšťat současně také autokrinní a parakrinní funkce, jako je indukce sekrece bioaktivních slinných proteinů pomocí exocytózy během sání (shrnutí v Sauer a kol., 2000) a vylučování vody během sání, jak bylo prokázáno u *Amblyomma americanum* (Qian a kol., 1998).

Prostaglandiny a leukotrieny jsou důležitými signalizačními molekulami také u *R. prolixus*, kde působí v buněčné imunitní odpovědi v hemolymfě a tukovém tělese (Garcia a kol., 2010). Podobně zásadní funkci v obraně organismu má prostaglandin E₂ u komárů. Bylo prokázáno, že u *Anopheles albimanus* indukuje expresi antimikrobních proteinů ve střevě, tukovém tělese, Malpighiho trubicích a ovariolech (García Gil de Muñoz a kol., 2008) a u *Ae. aegypti* moduluje sekreci tekutin v Malpighiho trubicích (shrnutí v Stanley a Kim, 2011).

3 METODIKA

3.1 Laboratorní zvířata

Phlebotomus argentipes a Phlebotomus papatasi:

Pro pokusy byli použiti flebotomové z chovů Katedry parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Kolonie *P. argentipes* z Indie je na Katedře parazitologie chována od roku 2008 za standardních podmínek (Volf a Volfová, 2011) při teplotě 26 °C. Pro dílčí pokus byla též použita kolonie *P. papatasi* z Turecka, který je chován na Katedře parazitologie od roku 2005 při stejné teplotě.

Mesocricetus auratus:

Po vzoru pokusů, které byly publikovány v Ghosh a Mukhopadhyay (1998), byli za modelové hostitele pro *P. argentipes* zvoleni křečci syřští (*Mesocricetus auratus*). Křečci pocházeli z chovů Katedry parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Pokusná zvířata samčího i samičího pohlaví byla do experimentů zapojena od věku tří měsíců, kdy dosáhla minimální hmotnosti 100 g.

3.2 Sání flebotomů na imunizovaném hostiteli

Aby si vytvořili specifické protilátky proti slinám *P. argentipes*, bylo šest křečků nejprve imunizováno opakovanou expozicí těmto flebotomům. Dalšíh šest křečků sloužících jako negativní kontrola nepřišlo s flebotomy nikdy do kontaktu. Po imunizaci bylo provedeno sání, v němž jedna polovina flebotomů sála na opakovaně pobodaných křečcích a druhá polovina na naivních křečcích (kontrola). Důraz byl kladen na to, aby flebotomové byli stejně staří a sáli ve stejnou dobu.

3.2.1 Imunizace křečků

Křečci z experimentální skupiny byli imunizováni opakovanou expozicí samicím *P. argentipes*. Toto sání probíhalo standardním způsobem v sítkách umístěných v temném prostředí v chovné místnosti. Zvířata měla oči zakryté vlhkou vatou a pro udržení tepelného komfortu byla podložena polystyrenovou podložkou. Schéma imunizace křečků označených

číslem a zkratkou I (imunizovaný), která probíhala v sedmi- až patnáctidenních odstupech, zobrazuje tabulka I. Křečci byli při každém sání vystaveni 100 až 290 samicím *P. argentipes*.

Tab. I: Schéma imunizace křečků.

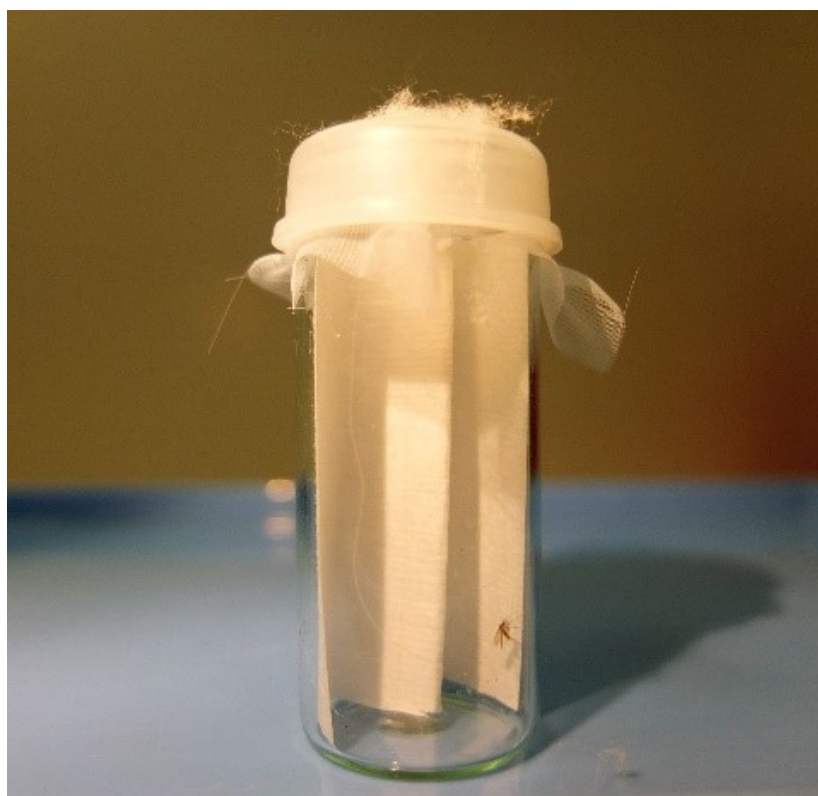
Křeček	1. expozice	2. expozice	3. expozice	4. expozice	5. expozice	6. expozice
	Datum Počet samic	Datum Počet samic	Datum Počet samic	Datum Počet samic	Datum Počet samic	Datum Počet samic
1 I	10. 9. 2015 neuvedeno	25. 9. 2015 neuvedeno	5. 10. 2015 140	12. 10. 2015 120	19. 10. 2015 110	2. 11. 2015 neuvedeno
2 I	10. 9. 2015 neuvedeno	25. 9. 2015 neuvedeno	9. 10. 2015 110	23. 10. 2015 160	30. 11. 2015 neuvedeno	6. 11. 2015 neuvedeno
3 I	17. 9. 2015 neuvedeno	2. 10. 2015 220	9. 10. 2015 110	16. 10. 2015 290	23. 10. 2015 160	3. 11. 2015 neuvedeno
4 I	4. 3. 2016 150	1. 3. 2016 150	18. 3. 2016 150	25. 3. 2016 150	1. 4. 2016 150	8. 4. 2016 150
5 I	11. 3. 2016 150	18. 3. 2016 150	25. 3. 2016 150	1. 4. 2016 150	8. 4. 2016 150	15. 4. 2016 150
6 I	18. 3. 2016 150	25. 3. 2016 150	1. 4. 2016 150	8. 4. 2016 150	15. 4. 2016 150	22. 4. 2016 150

3.2.2 Sání *P. argentipes* na imunizovaných křečcích

Týden po poslední (šesté) expozici křečků flebotomům za účelem imunizace byla imunizovaný i kontrolním jedincům odebrána krev a ihned poté bylo zahájen pokus se sáním flebotomů na opakovaně pobodaném hostiteli. Jak je uvedeno v tabulce I, imunizace byly rozvrženy tak, aby končily s týdenními rozestupy, a proto byly i pokusy prováděny v týdenních intervalech vždy s jedním imunizovaným a jedním kontrolním křečkem. Do každé ze dvou označených sítí (kontrolní a experimentální) bylo umístěno sto samic 5 – 7 dnů starých. Imunizovaný i kontrolní křeček byli anestetizováni a oči jim byly zakryty vlhkou vatou. Kvůli tepelnému komfortu byli podloženi polystyrenovou podložkou. Sání probíhalo v temném prostředí po dobu 45 min. Nenasáté samice byly ze sítě odstraněny a usmrceny. Nasátým samicím byla zajištěna dostatečná vlhkost a 50% cukerný roztok na vatě a byly ponechány po 48 hodin v sítích v chovné místnosti.

3.2.3 Studium ovipozice a mortality

Nasáté a vydefekované samice byly po jedné umístěny do připravených skleniček. Každá sklenička byla vybavena čtvercem filtračního papíru o rozměrech 5x5 cm a její ústí bylo přikryto monofilem s otvorem vyplněným vatou a plastovým víčkem (viz obrázek č. 1). Filtrační papír byl navlhčen destilovanou vodou, stejně jako filtrační papír vystýlající dózy pro uskladnění skleniček. Označené skleničky v dózách zabalených do igelitu byly umístěny v chovné místnosti při teplotě 26 °C. V každé dóze bylo uchováváno maximálně 54 skleniček se samicemi. Pozorování ovipozice a mortality bylo započato vždy 12 hodin poté, co byly samice umístěny do skleniček a opakováno každých 12 hodin po dobu pěti dní. Doba úmrtí samice a počet nakladených vajíček byly zaznamenávány do protokolu. Tento postup byl aplikován jak při experimentech se sáním flebotomů na imunizovaném hostiteli, tak při sání flebotomů na kuřecí membráně (viz dále).



Obr. 1: Samice umístěná do skleničky pro studium ovipozice a mortality.

3.3 Odběr sér

Naivním i imunizovaným křečkům byla odebrána krev z brachiálního plexu (*plexus brachialis*) způsobem znázorněným na obrázku č. 2. Před samotným odběrem krve byli křečci uvedeni do anestezie kombinací xylazinu a ketaminu. Objem odebrané krve se pohyboval v rozmezí od 0,2 ml do 0,4 ml (viz tabulka II). Následně z ní bylo po centrifugaci (5 min při 6000 rpm) odebráno sérum, jehož aliquoty byly do dalšího zpracování uchovány při - 80 °C.



Obr. 2: Odběr krve u křečka.

Tab. II: Objemy krve odebrané křečkům.

I: křeček imunizovaný opakovaným sáním, N: neimunizovaný křeček (naivní).

Křeček	Pohlaví	Váha křečka	Objem odebrané krve
1 I	Samec	167 g	200 µl
1 N	Samec	165 g	400 µl
2 I	Samec	155 g	100 µl
2 N	Samec	180 g	400 µl
3 I	Samec	180 g	200 µl
3 N	Samec	170 g	400 µl
4 I	Samice	164 g	300 µl
4 N	Samice	137 g	300 µl
5 I	Samice	170 g	400 µl
5 N	Samice	157 g	500 µl
6 I	Samec	190 g	500 µl
6 N	Samec	200 g	500 µl

Použité roztoky:

Narketan (Vétoquinol): injekční roztok ketaminu 100 mg/ml; dávkování 50 mg/kg i. m.

Rometar (Bioveta a. s.): injekční roztok xylazinu 20 mg/ml; dávkování 2 mg/kg i. m.

3.4 Příprava antigenu ze slinných žláz *P. argentipes*

Jako antigen byl zvolen homogenát slinných žláz. Pět až sedm dní staré samice byly znehybněny podchlazením na ledě. Slinné žlázy byly získány po oddělení hlavy flebotoma od těla na podložním sklíčku v kapce 10x zředěného Tris pufru, za pomoci binokulární lupy, pinzety a minucí. Slinné žlázy byly skladovány v 10x zředěném Tris pufru při -80 °C.

Použité roztoky:

Zásobní Tris-NaCl (pH 7, 6): 200 mM Tris (Sigma-Aldrich), 1500 mM NaCl

3.5 ELISA

Průkaz specifických protilátek proti slinným proteinům *P. argentipes* v křeččím séru byl proveden metodou ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*).

Slinné žlázy byly zhomogenizovány trojím rozmrazením a zmrazením v tekutém dusíku a naředěny do navazovacího roztoku v koncentraci 1/5 žlázy na 100 µl navazovacího roztoku. Homogenát v navazovacím roztoku byl nanesen do jamek destičky s výjimkou čtyř jamek pro metodickou kontrolu, do nichž byl napipetován pouze odpovídající objem navazovacího roztoku bez antigenu. Inkubace na destičce proběhla přes noc při 4 °C. Poté byla destička dvakrát promyta promývacím roztokem PBS-Tween (v objemu 100 µl na jamku) a inkubována s 6% blokovacím roztokem v PBS-Tween po dobu 60 minut při 37 °C. Po uplynutí této doby byly jamky třikrát promyty promývacím roztokem a následně do nich byly nanесeny vzorky sér ředěné v poměru 1:100 2% blokovacím roztokem v objemu 100 µl na jamku s výjimkou šesti jamek pro metodickou kontrolu. Do nich byl napipetován jen samotný blokovací roztok. Vzorky na destičce byly inkubovány 90 minut při 37 °C. Před nanесením 100 µl konjugátu ředěného v PBS-Tween v poměru 1:1000 do každé jamky kromě čtyř pro metodickou kontrolu byly jamky čtyřikrát promyty. Inkubace probíhala opět při 37 °C, tentokrát však pouze 60 minut. Po šestinásobném promytí jamek byla vyvolána barevná reakce substrátovým roztokem, ortophenylendiaminem a 30% peroxidem vodíku. Reakce probíhala v pokojové teplotě a ve tmě (destička byla zakryta hliníkovou fólií), po uplynutí šesti minut byla zastavena 10% kyselinou sírovou pipetovanou v objemu 100 µl na jamku. Absorbance byla měřena pomocí fluorimetru (Infinite M200 TECAN, Schoeller) v programu Magellan 7.1 při 492 nm.

Použité roztoky:

Navazovací roztok (pH 9, 0): 20 mM Na₂CO₃ - NaHCO₃

PBS (pH 7, 2): 1500 mM NaCl; 30 mM KCl; 80 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 10 mM KH₂PO₄

PBS-Tween (pH 7, 2): PBS; 0,05% Tween 20 (Serva)

Blokovací roztok: odtučněné sušené mléko (BIO-RAD); PBS-Tween (pH 7,2)

Konjugát (AbD Serotec): polyklonální IgG (Goat anti hamster IgG: HRP)

Substrátový roztok (MccIlweine fosfát-citrát, pH 5, 5): 110 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O; 500 mM, kyselina citrónová

O-phenylendiamin (Sigma-Aldrich): 5 mg na 10 ml substrátového roztoku

30% peroxid vodíku (Fluca Analytical): 10 µl na 10 ml substrátového roztoku

10% kyselina sírová

3.6 SDS – PAGE elektroforéza

Proteiny ze slinných žláz *P. argentipes* byly separovány SDS-PAGE elektroforézou za neredukujících podmínek na polyakrylamidovém gelu silném 0,75 mm. Slinné žlázy s přidáním neredukujícím vzorkovým pufrům v poměru 2:1 byly povařeny po dobu tří minut. Do jamek vytvořených pětijamkovým hřebenem bylo nanášeno po 30 slinných žlázách a jedna náležela standardu (Bench Mark, Invitrogen). Proteiny byly separovány v prostředí SDS pufru při limitním napětí 200 V pomocí přístroje Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad).

Použité roztoky:

Neredukující vzorkový pufr: 0,6 ml 1000 mM Tris-HCl (pH 6, 8); 5 ml 50% glycerolu; 2 ml 10% SDS; 1 ml 1% bromfenolové modři; 1,4 ml destilované vody

10% separační gel (objemy pro přípravu dvou gelů):

- roztok A (2 ml): 40% akrylamid; bis-akrylamid (Bio-Rad)
- roztok B (2 ml): 75 ml 2000 mM Tris-HCl (pH 8,8); 4 ml 10% SDS; 21 ml destilované vody; tetrametyletylendiamin (TEMED, AppliChem) (5 µl)
- roztok G (50 µl): 10% peroxodisíran amonný
- destilovaná voda (4 ml)

4% startovací gel (objemy pro přípravu dvou gelů):

- roztok A (0,4 ml)
- roztok C (1 ml): 50 ml 1000 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 ml 10% SDS; 46 ml destilované

- vody
- destilovaná voda (2,6 ml)
- TEMED (5 µl)
- roztok G (40 µl)
- izopropanol

Standard (Invitrogen BenchMark)

SDS pufr (pH 8,3): Tris/Glycin/SDS pufr (Bio-Rad); 25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1% SDS

3.7 Hmotnostní spektrometrie

Gel se separovanými proteiny (viz kapitola 2.2.4 SDS-PAGE elektroforéza) byl třikrát po dobu 5 minut promýván v destilované vodě. Poté byl gel 60 minut barven v Coomassie G-250 Stain. Po uplynutí této doby byla barva vymyta destilovanou vodou. Následně byl gel předán do Laboratoře hmotnostní spektrometrie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, kde byl dále zpracován.

Jednotlivé proužky obsahující proteiny byly vyříznuty z SDS PAGE gelu obarveného Coomassie, nařezány na malé kousky (1x1 mm), sonikovány po dobu 30 minut v 50% acetonitrilu a 50 mM bikarbonátu amonném, a usušeny v acetonitrilu. Disulfidické můstky byly přerušeny pomocí 10 mM dithiotreitolu v 100 mM bikarbonátu amonném při 60°C po dobu 30 min. Poté byly vzorky opět vysušeny pomocí acetonitrilu a volné cysteinové zbytky byly blokovány pomocí 55 mM jodoacetamidu v 100 mM bikarbonátu amonného po dobu 10 min při pokojové teplotě bez přístupu světla. Proteiny byly naštěpeny pomocí roztoku 10% acetonitrilu, 40 mM bikarbonátu amonného a 13 ng/µl trypsinu při teplotě 37 °C přes noc. Poté k nim bylo přidáno 150 µl 50% acetonitrilu s 0,5% kyselinou mravenčí a dále byly sonikovány po dobu 30 min. Supernatant obsahující peptidy byl přemístěn do nové mikrocentrifugační zkumavky s dalšími 150 µl elučního roztoku a sonikován 30 min. Tento roztok byl odebrán, smíchán s předchozím roztokem a vysušen pomocí opařovačky Speedvac. Usušené peptidy byly resuspendovány v 2% acetonitrilu s 0,1% trifluoroctovou kyselinou, odsoleny na kolonách se sorbentem C18 (Sulpeco) (shrnutí v Ishihama, 2005), vysušeny ve vakuové sušičce a poté resuspendovány v 20 µl 1% kyseliny trifluoroctové.

Pro LC/MS analýzu byla použita kolona Nano Reversed phase (EASY-Spray column). Vzorky byly sbírány do kolony (Acclaim PepMap300) při průtoku 15 µl/min. Peptidy byly vystavené gradientu pufru B od 2% do 40% po 60 min při průtoku 300 nl/min. Peptidové

kationty byly převedeny na ionty v plynné fázi elektrosprejovou ionizací a analyzovány na Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT- qIT, Thermo).

Spektra byla získána pomocí hmotnostního spektrometru Orbitrap Fusion (Thermo Scientific). Nejintenzivnější prekursorzy byly izolovány kvadrupólem s 1,6 m/z izolačním oknem a fragmentovány pomocí HCD. Ionty fragmentů byly detekovány v iontové pasti s normálním skenovacím rozsahem a rychlým skenovacím rozsahem s maximálním časem vstřikování 35 ms.

Data byla zpracována v MaxQuant LFQ (Cox a kol., 2014). LFQ kvantifikace byla použita pro odhad relativního množství každého proteinu. Hledání bylo provedeno pro poslední verzi databáze *Phlebotomus papatasi* z Uniprot, všechny známé sekvence na NCBI (44) a Uniprot (38) z *Phlebotomus argentipes*, sekvence z *Phlebotomus orientalis* cDNA knihovny (cca 1000) a databáze známých kontaminací. Byly nastaveny tyto modifikace: Cystein Carbamidomethyl (unimod nr:4) jako statická, methionoinová oxidace (unimod : 1384) a N terminální acetylace proteinu (unimod : 1) jako variabilní. Další zpracování dat probíhalo v programu Perseus (Tyanova a kol., 2016).

Použité roztoky:

Coomasie G-250 Stain (Bio-Rad)

50% acetonitril

50 mM bikarbonát amonný

10 mM dithiotreitol v 100 mM bikarbonátu amonném

55mM jodoacetamid v 100mM ABC

10% acetonitril, 40mM bikarbonát amonný, 13 ng/μl trypsinu

Eluční roztok: 50% acetonitril, 0,5% kyselina mravenčí

2% acetonitril

0,1% trifluoroctovou kyselinou

1% kyselina trifluoroctová

Pufr A mobilní fáze: voda; 2% acetonitril; 0,1% kyselina mravenčí

Pufr B mobilní fáze: 80% acetonitril; 0,1% kyselina mravenčí

Nanášecí pufr: voda; 2% acetonitril; 0,1% kyselina trifluoroctová

3.8 Imunoblot

Gel z SDS-PAGE elektroforézy byl pomocí přístroje iBlot (Invitrogen) přebílen na nitrocelulóзовou membránu, na které byly slinné proteiny reverzibilně zviditelněny působením barviva Ponceau S po dobu 10 minut. Poté bylo barvivo vymyto destilovanou vodou a membrána nařezána na úzké proužky. Pouze standard a malá část slinného profilu byly odděleny a obarveny amidočerní. Přebytké barvivo bylo odstraněno pomocí odbarvovacího roztoku, který byl poté vymyt destilovanou vodou.

Proužky nitrocelulóзовé membrány byly očíslovány a inkubovány s 5% blokovacím roztokem na destičce s úzkými drážkami při teplotě 4 °C. Druhý den byly proužky třikrát promyty na třepačce po dobu 5 minut v roztoku Tris-Tween. Poté bylo do jamek přidáno sérum. V prvním pokusu bylo každé sérum naředěno roztokem Tris-Tween ve dvou poměrech – 1:100 a 1:50, ve druhém pokusu byla použita pouze koncentrace 1:100. V obou experimentech byly proužky se séry inkubovány 60 minut při pokojové teplotě. Po dalším promytí (třikrát 5 minut) byl k proužkům napipetován konjugát ředěný v Tris-Tween v poměru 1:1000. Po hodinové inkubaci při pokojové teplotě byl konjugát vymýván dvakrát po dobu pěti minut roztokem Tris-Tween a dalších pět minut roztokem Tris-NaCl. Barevná reakce byla vyvolána pomocí substrátového roztoku a po objevení hnědých proužků zastavena přidáním destilované vody na 10 minut. Veškeré inkubace a promývání byly prováděny na třepačce.

Použité roztoky:

Ponceau S: 0,2% Ponceau S (Sigma-Aldrich); 3% kyselina octová

Amidočerní: 0, 1% amidočerní (Merck); 25% isopropanol; 10% kyselina octová

Odbarvovací roztok: 25% isopropanol; 10% kyselina octová

Blokovací roztok: odtučněné sušené mléko (BIO-RAD); destilovaná voda

Tris-NaCl (pH 7, 6): 200 mM Tris (Sigma-Aldrich); 1500 mM NaCl

Tris-Tween: 20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20 (Serva)

Konjugát (AbD Serotec): polyklonální IgG (Goat anti hamster IgG: HRP)

Substrátový roztok: 20 ml Tris-NaCl; 0,01 g 3,3'-diaminobenzidin tetrachlorid hydrátu (DAB, Sigma-Aldrich); 6 µl peroxidu vodíku (Fluca Analytical)

3.9 Histologie tkání exponovaných flebotomům

3.9.1 Příprava histologických řezů

Anestetizovaní křečci byli křečci usmrceni vykrvením hodinu po sání flebotomů na jejich uších. Uši byly ihned uloženy do 4% formaldehydu. Po třech dnech byla fixáž vymyta kohoutkovou vodou. Tento vymývací krok byl opakován třikrát a probíhal na třepačce.

Za stálého třepání bylo provedeno také odvodnění tkání vzestupnou alkoholovou řadou (75% ethanol, 96% ethanol a 100% ethanol; v každé koncentraci 3x 30 minut). Uši byly projasněny dvěma lázněmi v xylenu trvajících 20 minut. Poté byly převedeny na 15 minut do směsi parafínu a xylenu a následně třikrát po dobu 30 minut syceny roztaveným parafínem při teplotě 37 °C. Každý vzorek byl rozdělen na dvě poloviny a umístěn do označených forem s roztaveným parafínem, v nichž byl ponechán po dobu dvou dnů. Po utužení parafínu byly tkáně krájeny na mikrotomu (Shandon Finesse) na 5 µm silné řezy, které byly umísťovány na hladinu vlažné vody, aby se lépe napnuly. Odtud byly řezy nabírány na sklíčka a ponechány k zaschnutí na vyhřívané desce (P-Lab a.s.) při 37 °C po dobu 30 minut.

Před barvením byly řezy zbavené parafínu dvěma desetiminutovými lázněmi v xylenu a zavodněny sestupnou alkoholovou řadou (100% ethanol, 96% ethanol, 75% ethanol; v každé koncentraci byly řezy ponechány po dobu 2 minut) zakončenou lázní v destilované vodě.

3.9.2 Barvení hematoxylin-eosin

Řezy byly 10 minut barveny v Ehrlichově hematoxylinu a následně promývány slabým proudem vody. Poté následovalo barvení v eosinu po dobu 3 sekund. Toto barvivo bylo taktéž vymyto proudem vody. Nabarvené preparáty byly odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (75% ethanol, 96% ethanol, 100% ethanol; v každé koncentraci byly řezy ponechány po dobu 1 minuty) a projasněny lázní v xylenu po dobu jedné minuty.

3.9.3 Barvení toluidinovou modří

Řezy byly barveny v pracovním roztoku toluidinové modři po dobu 3 minut a následně třikrát promyty v destilované vodě. Diferenciace probíhala rychlým ponořením sklíček do 95%

(10 opakování) a 100% (2x 10 opakování) ethanolu. Preparáty byly projasněny dvěma lázněmi v xylenu po dobu 3 minut.

3.9.4 Montování preparátů

Po obarvení byly řezy montovány do média DPX, přikryty krycím sklíčkem, zatíženy a ponechány k zaschnutí po dobu dvou dnů. Fotografie histologických řezů byly zhotoveny pomocí programu QuickPHOTO Micro 3.0.

Použité roztoky:

4% formaldehyd: 36 – 38% roztok formaldehydu (Lachner) 10x ředěný destilovanou vodou

Ethanol v koncentracích 75%, 96% a 100%

Xylen (Lachner)

Parafín (Paraplast Plus, Surgipath)

Ehrlichův hematoxylin: 100 ml 100% ethanolu; 2 g hematoxylinu; 100 ml destilované vody; 3 g $KAl(SO_4)_2$ (kamenec draselný); 100 ml glycerinu; 10 ml kyseliny octové ledové

Eosin Y

Zásobní roztok toluidinové modři: 1 g toluidinové modři O (Sigma-Aldrich); 100 ml 70% alkoholu

1% chlorid sodný (pH 2,3): chlorid sodný; destilovaná voda; 1000 mM HCl

Pracovní roztok toluidinové modři (pH 2,4): 5 ml zásobního roztoku toluidinové modři; 45 ml 1% chloridu sodného (pH 2,3)

DPX médium (Sigma-Aldrich)

3.10 Membránové sání s biogenními aminy a prostaglandinem E₂

Sání flebotomů na membráně z kuřecí kůže umožňuje sledovat vliv nejrůznějších látek. Kůže byla vypitvána ze hřbetu jednodenních kuřat zbavených peří. Kůže byly promyty dvakrát po dobu 10 minut v 70% ethanolu a následně dvakrát 10 minut ve sterilním fyziologickém roztoku. Do dalšího použití byly uchovávány v Petriho miskách utěsněných parafilmem při teplotě -20 °C. Před experimentem byly kůže rozmrazeny a za pomoci parafilmu napnuty na skleněná krmítka tak, aby flebotomové sáli na vnější straně kůže. Krmítko naplněné krví je zobrazeno na obrázku č. 3.

Histamin (Sigma-Aldrich) a serotonin (Sigma-Aldrich) byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a použity v konečné koncentraci 0,5 mg/ml krve u histaminu a 0,015 mg/ml krve u serotoninu. Prostaglandin E₂ (Sigma-Aldrich) byl ředěn v 96% ethanolu. Tento roztok byl dále ředěn fyziologickým roztokem na finální koncentraci ethanolu 7,9%. Finální koncentrace prostaglandinu E₂ byla 0,03 mg/ml krve a ethanol tvořil 0,15% krve. Do krve pro kontrolní skupinu byl přidán jen odpovídající objem fyziologického roztoku anebo v případě kontroly k sání na krvi s prostaglandinem 7,9% roztok ethanolu ve fyziologického roztoku. Každé krmítko bylo naplněno 3 ml defibrinované králičí krve a upevněno do laboratorního stojanu. Pomocí hadiček byla krmítka připojena k vodní lázni zahřáté na 37 °C. Do dvou označených sítí (experimentální a kontrolní) bylo umístěno po stove stejné starých samic flebotomů. Experimentální sání probíhalo v zatemněné místnosti při teplotě vzduchu mezi 26 – 31 °C po dobu 50 minut. Pro pokus s membránovým sáním krve s přidáním histaminem byl z důvodu špatného stavu kolonie *P. argentipes* použit *P. papatasi*. Ve všech případech byla po skončení experimentu flebotomům poskytnuta dostatečná vlhkost a 50% cukerný roztok a byli ponecháni po dobu 48 hodin (*P. papatasi* 120 hodin) v chovné místnosti. Poté byly samice umístěny do skleniček a pozorovány, jak je popsáno v kapitole 3.2.3.



Obr. 3: Připravené krmítko.

3.11 Statistika a použité programy

K analýze dat byl použit program R (<http://cran.r-project.org/>). Rozdíly mezi skupinami v průměrném počtu nakladených vajíček na jednu samici byly analyzovány pomocí Poisson GLM (General Linearized Models). Rozdíly v mortalitě mezi skupinami byly analyzovány pomocí proporcionálního testu. Za signifikantní byly považovány výsledky s $p < 0.05$.

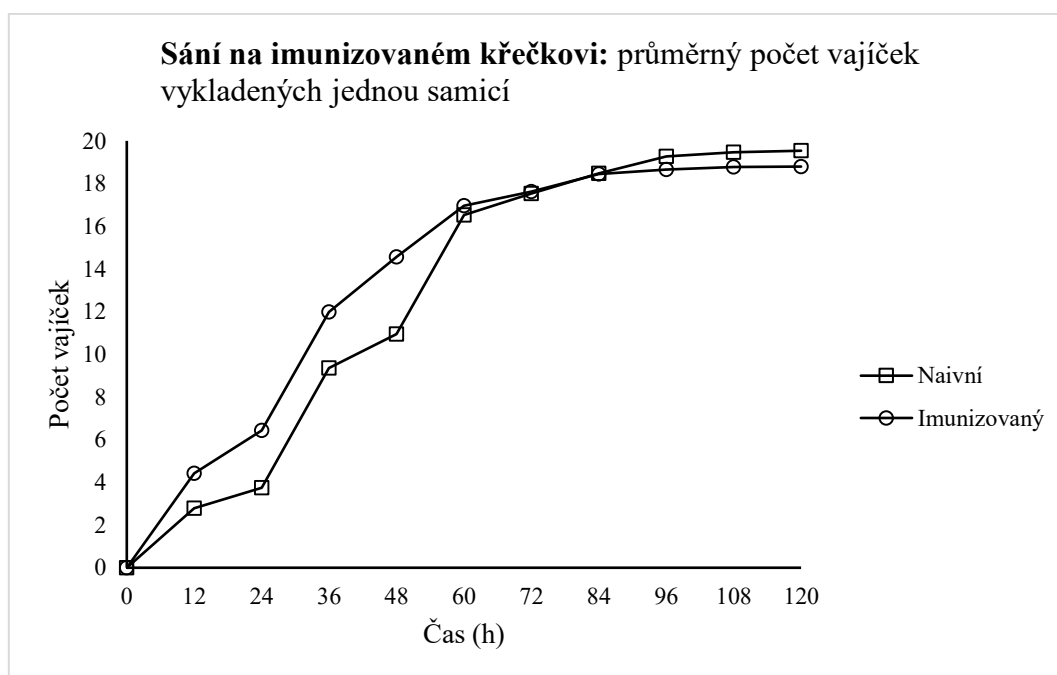
4 VÝSLEDKY

4.1 Sání na imunizovaných křečcích a jeho efekt na fekunditu a mortalitu

Fekundita (počet nakladených vajec) a mortalita (procento uhynulých samic) byly porovnávány u samic *P. argentipes* sátých na dvou skupinách křečků. Šest křečků bylo imunizováno opakovaným sáním *P. argentipes*, dalších šest sloužilo jako negativní kontrola.

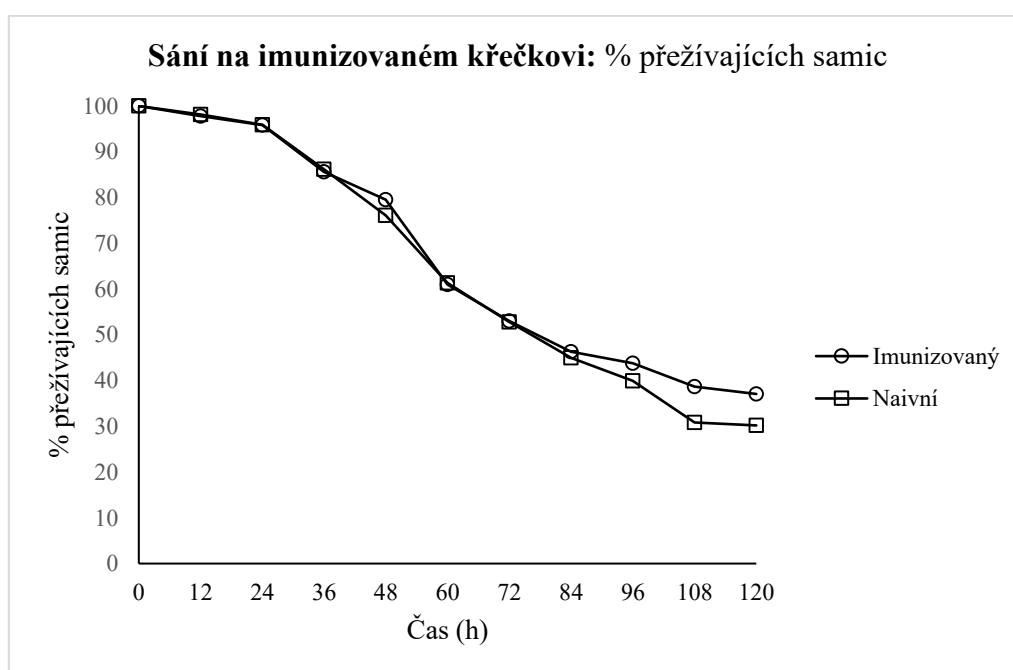
V pokusu byla vždy jedna polovina flebotomů sáta na imunizovaném a druhá polovina na kontrolním křečkovi, a pokus byl šestkrát opakován.

Průměrný počet vajíček nakladených jednou samicí sající na imunizovaném křečkovi byl 18,8 a na naivním 19,5. Mezi skupinami nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl (GLM, $p = 0,679$, $F = 0,1719$). Na obrázku č. 4 je znázorněn průběh kladení vajec samicemi *P. argentipes* v jednotlivých intervalech. Výsledky v intervalech 12, 24, 36 a 48 hodin od umístění do skleniček (60, 72, 84 a 96 hodin po sání) nasvědčují tomu, že samice sající na imunizovaných křečcích kladou vajíčka dříve, než samice kontrolní.



Obr. 4: Průměrný počet vajíček vykladených samicemi *P. argentipes*. Graf znázorňuje průměrný počet vajíček vykladených jednou samicí (osa y) v časových intervalech po oddělení samic do skleniček (osa x). Ovipozice byla sledována u 318 samic v kontrolních skupinách sajících na neimunizovaných křečcích (Naivní) a 312 samic ve skupinách flebotomů sajících na imunizovaných křečcích (Imunizovaný).

Sledováním mortality bylo zjištěno, že mezi skupinami flebotomů sátými na imunizovaných nebo naivních křečcích neexistuje žádný signifikantní rozdíl ($\chi^2 = 3,04$, $df = 1$, $p = 0,08133$). Z celkem 600 samic, kterým byli nabídnuti imunizovaní křečci, se jich nasálo 445 (tj. 74,4% z 600) a 48 hodin jich přežilo 312 (52% z 600). Ve skupinách sajících na naivních křečcích ze 600 samic jich přijalo krev 381 (63,5% z 600) a do počátku sledování ovipozice a mortality jich přežilo 318 (53% z 600). Ve skupinách sajících na imunizovaných křečcích uhynul stejný počet samic před vykladením, jako ve skupinách sajících na naivních křečcích (47). V intervalech 12 – 84 hodin po sání byly mortality prakticky shodné, na konci pokusu, 120 hodin po sání, byla úmrtnost ve skupinách sajících na imunizovaném křečkovi 62,9% a ve skupinách kontrolních (sajících na naivních křečcích) 69,8% (viz obrázek č. 5). Signifikantní rozdíl nebyl pozorován ani u nuliparních samic ve skupinách sajících na naivním (15%) nebo imunizovaném (14,8%) křečkovi ($\chi^2 = 0$, $df = 1$, $p = 1$).



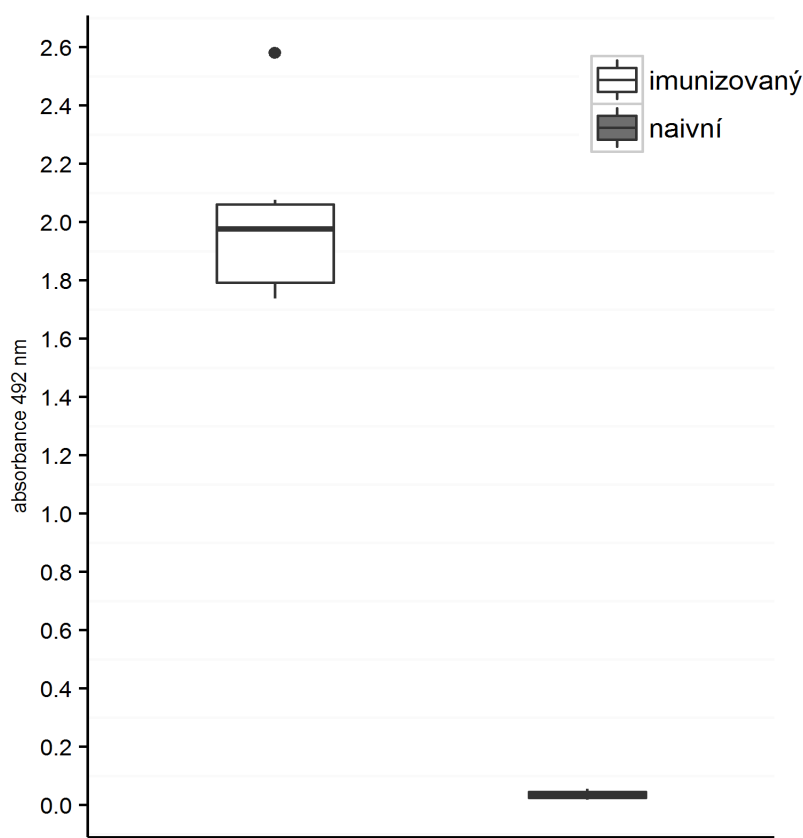
Obr. 5: Mortalita samic *P. argentipes* sajících na imunizovaném a naivním hostiteli. Graf porovnává % přežívajících samic ve skupinách sajících na imunizovaných křečcích (Imunizovaný; celkem 312 samic) a v kontrolních skupinách sajících na neimunizovaném křečkovi (Naivní; celkem 318 samic). Mortalita byla sledována po 120 hodin od oddělení samic do skleniček (48 hodin po sání).

4.2 Detekce specifických protilátek metodou ELISA

Specifické IgG protilátky proti slinným proteinům *P. argentipes* byly v sérech opakovaně pobodaných křečků prokázány metodou ELISA. U imunizovaných křečků se průměrné absorbance pohybovaly v rozmezí od 1,80 do 2,64 a u naivních křečků mezi 0,08 a 0,12. Absorbance jamek pro metodické kontroly dosahovala hodnot od 0,06 do 0,08. Hodnoty absorbancí sér a metodických kontrol shrnuje tabulka III. Boxplot (obrázek č. 6) zobrazuje zvýšený obsah specifických protilátek v sérech opakovaně pobodaných křečků oproti kontrolním sérum.

Tab. III: Naměřené absorbance sér a metodických kontrol. Průměr naměřené absorbance sér imunizovaných křečků (I) se pohybuje od 1,80 do 2,64, neimunizovaných křečků (N) od 0,08 do 0,12 a metodických kontrol (MK) od 0,06 do 0,08.

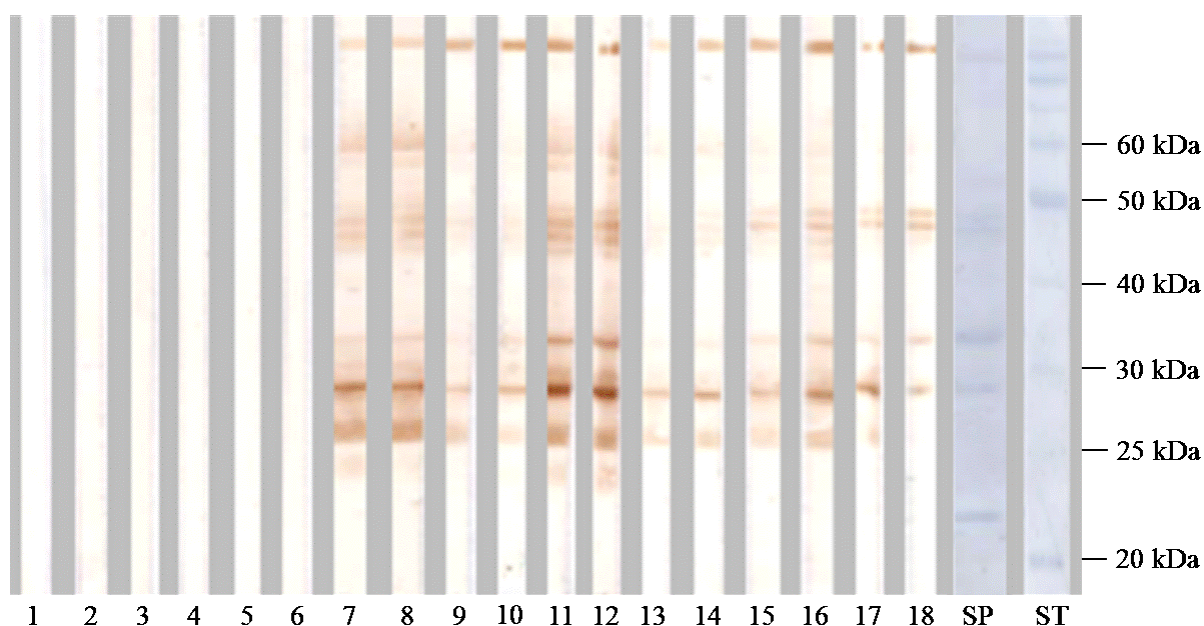
Sérum	Duplikát 1	Duplikát 2	Průměr
1 I	2,66	2,62	2,64
2 I	2,10	2,06	2,08
3 I	2,14	1,85	2,00
4 I	1,96	2,31	2,14
5 I	1,75	1,86	1,80
6 I	1,86	1,74	1,80
1 N	0,09	0,08	0,08
2 N	0,11	0,10	0,10
3 N	0,08	0,09	0,10
4 N	0,10	0,12	0,10
5 N	0,12	0,12	0,12
6 N	0,07	0,09	0,08
MK Ag+Ab-Px-	0,07	0,08	0,08
MK Ag+Ab-Px+	0,06	0,06	0,06
MK Ag-Ab-Px+	0,09	0,08	0,08
MK Ag-Ab-Px-	0,06	0,06	0,06



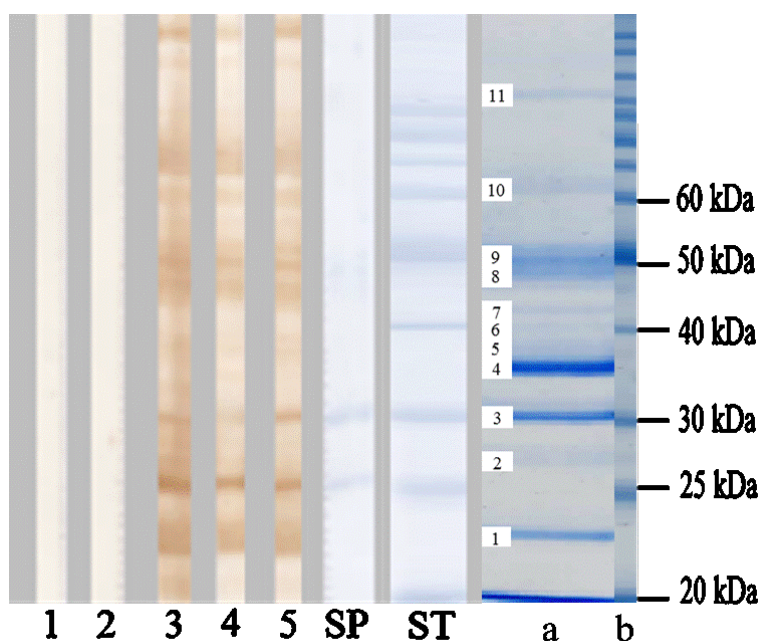
Obr. 6: Porovnání hladin IgG protilátek proti slinám *P. argentipes* mezi kontrolními séry a séry imunizovaných křečků. Imunizovaní křečci byli vystaveni šesti sání 100 – 300 samic v intervalu 7 – 14 dní.

4.3 Identifikace hlavních antigenů ve slinách *P. argentipes*

Spektra rozpoznávaných proteinů byla podobná u sér ředěných v poměru 1:50 nebo 1:100 (obr. 7). Negativními kontrolami byla séra nepošťpaných křečků, která nerozeznávala žádné proteiny. Séra křečků opakovaně pobodaných samicemi *P. argentipes* rozpoznávala při imunoblotu s homogenátem slinných žláz nejméně 11 proteinových proužků (obr. 8). Některé slinné antigeny *P. argentipes* rozeznávané IgG imunoglobuliny ze séra křečků odpovídají SP06 proteinům, antigen 5-related proteinu (SP05), apyráze (SP03) a yellow-related proteinu (SP04). V oblasti mezi 20 a 25 kDa byly nalezeny nejméně čtyři potencionální antigeny nebo jejich fragmenty a v části gelu nad 50 kDa naopak nebyl nalezen žádný již charakterizovaný protein (tabulka IV).



Obr. 7: Imunoblot se séry naivních a opakovaně pobodaných křečků. 1, 3, 5 – séra naivních křečků ředěná 1:100; 2, 4, 6 – séra naivních křečků ředěná 1:50; 7, 9, 11, 13, 15, 17 – séra imunizovaných křečků ředěná 1:100; 8, 10, 12, 14, 16, 18 – séra imunizovaných křečků ředěná 1:50; SP – slinný profil barvený amidočerní; ST – standard barvený amidočerní.



Obr. 8: Imunoblot se séry naivních a imunizovaných křečků (ředěna 1:100) a gel barvený Coomasie. 1, 2 – séra naivních křečků; 3, 4, 5 – séra imunizovaných křečků; SP – slinný profil; ST – standard; a – gel se slinným profilem *P. argentipes* barvený Coomasie s bandy použitými pro identifikaci proteinů hmotnostní spektrometrií (1 – 11 viz tabulka IV); b – standard na gelu barvený Coomasie.

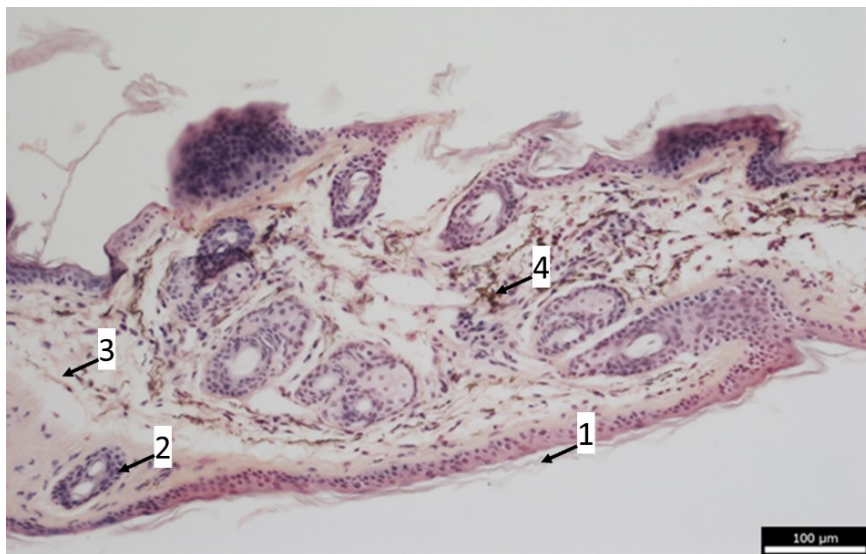
Tabulka IV: Identifikované antigenní proteiny rozeznávané IgG v křeččím séru. Intenzita pro daný poměr hmotnosti k náboji iontu (m/z) vyjadřuje zastoupení proteinů ve vzorku; čím více bylo detekováno peptidů/proteinů pro daný m/z , tím vyšší intenzita

Číslo pruhu	Intenzita	Mol. hmotnost [kDa]	ID proteinu	Název proteinu
1	34,986	28,794	ABA12141.1	27 kDa salivary D7-related protein SP10
	25,9786	26,886	ABA12138.1	25 kDa salivary protein SP06
	25,9577	45,43	ABA12136.1	43 kDa salivary yellow-related protein SP04
	24,6674	37,339	ABA12135.1	35 kDa putative salivary apyrase SP03
2	33,0017	26,886	ABA12138.1	25 kDa salivary protein SP06
	28,1013	28,794	ABA12141.1	27 kDa salivary D7-related protein SP10
	21,3361	29,489	ABA12149.1	27 kDa salivary protein SP20
3	36,1323	31,559	ABA12137.1	29 kDa salivary antigen 5-related protein SP05
	29,8233	26,886	ABA12138.1	25 kDa salivary protein SP06
	27,5661	28,794	ABA12141.1	27 kDa salivary D7-related protein SP10
	25,0498	31,645	ABA12147.1	29 kDa salivary protein SP17
4	38,4057	37,339	ABA12135.1	35 kDa putative salivary apyrase SP03
	35,3264	35,674	ABA12140.1	33 kDa salivary protein SP05
5	35,4549	37,339	ABA12135.1	35 kDa putative salivary apyrase SP03
	28,5099	45,43	ABA12136.1	43 kDa salivary yellow-related protein SP04
6	34,8006	37,339	ABA12135.1	35 kDa putative salivary apyrase SP03
	29,0543	45,43	ABA12136.1	43 kDa salivary yellow-related protein SP04
	28,5792	45,43	ABA12136.1	43 kDa salivary yellow-related protein SP04
8	37,2486	45,43	ABA12136.1	43 kDa salivary yellow-related protein SP04
9				neidentifikovaný
10				neidentifikovaný
11				neidentifikovaný

4.4 Histologie tkání exponovaných flebotomům

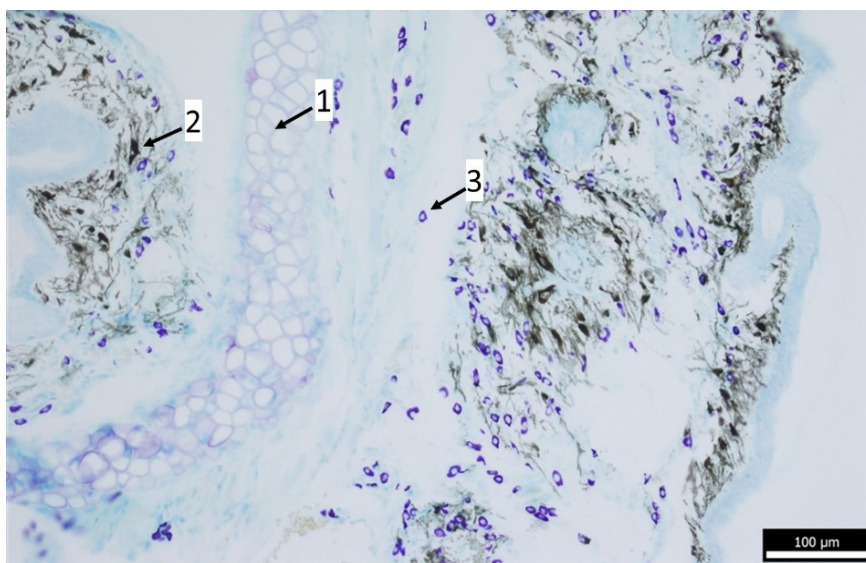
Z ušních boltců křečků opakovaně sátých samicemi *P. argentipes* a křečků kontrolních byly zhotoveny histologické preparáty, které byly vyhodnocovány světelným mikroskopem. Na řezech barvených přehledným barvením hematoxylin-eosin byla pozorována struktura boltce. Na jeho povrchu je patrné odlupující se *stratum corneum*, další vrstvy epidermis tvoří výrazněji zbarvený pás podél okraje řezu a na dvou místech vlivem zpracování tvoří tmavší plochy. V dermis jsou viditelné buňky pojiva, hnědě zbarvené melanocyty a chlupové folikuly (obrázek č. 9). Na řezech barvených toluidinovou modří jsou zejména v pojivu patrné fialově zbarvené mastocyty, na některých preparátech degranulované, ne však ve větší míře, než v kontrole. Na žádném ze vzorků nebyla pozorována výrazná infiltrace granulocytů. Další

z pozorovaných struktur byla chrupavka, epidermis, pojivo melanocyty a epidermis (obrázek č. 10). Na řezech exponovaných tkání nebyl pozorován edém.



Obr. 9: Histologický řez ušním boltcem křečka (hematoxylin-eosin).

- 1 - plochý rohovějící epitel;
- 2 - chlupový folikul;
- 3 – fibrocyt;
- 4 - melanocyt.



Obr. 10: Histologický řez boltcem ucha křečka (toluidinová modř).

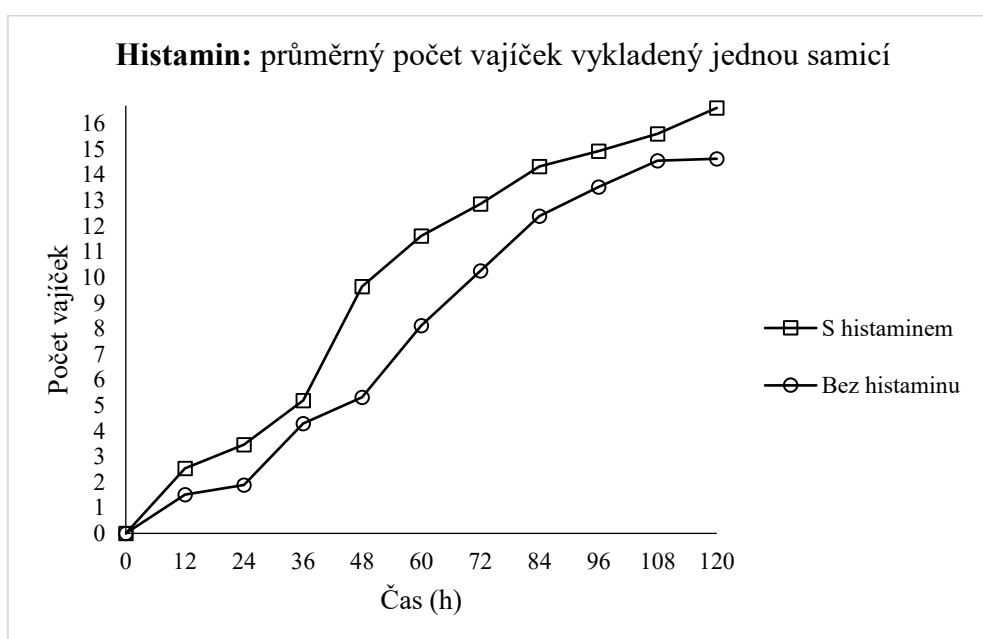
- 1 - chrupavka;
- 2 – melanocyt;
- 3 - žírná buňka.

4.5 Efekt sání s biogenními aminy a prostaglandinem E₂

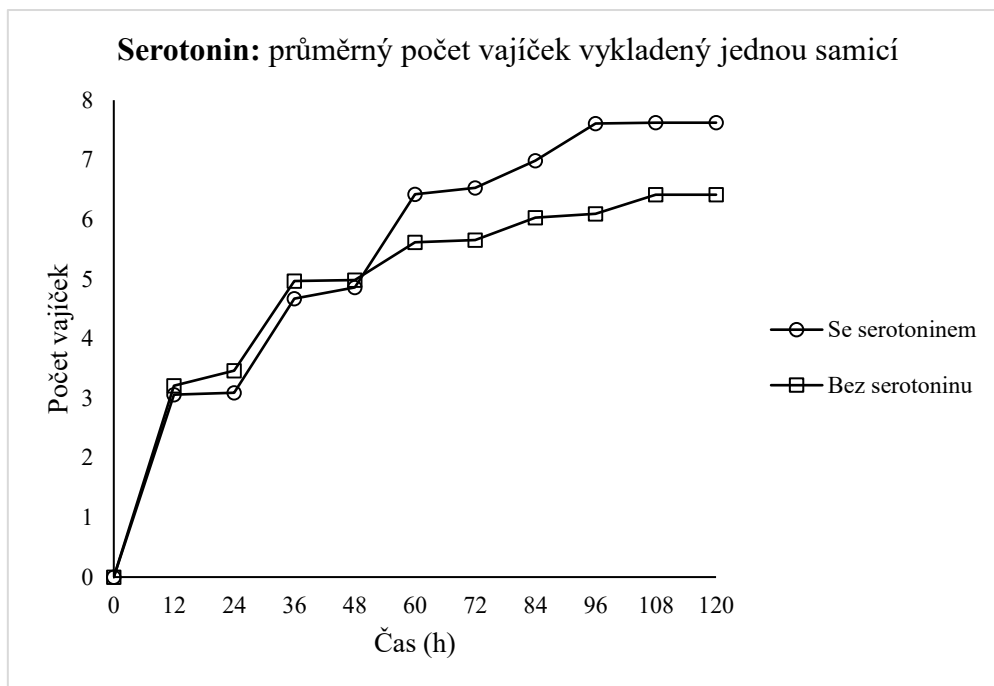
U samic sajících krev s přidaným serotoninem (GLM, $p = 0,503$, $F = 0,4541$), histaminem (GLM, $p = 0,479$, $F = 0,5031$) ani prostaglandinem E₂ (GLM, $p = 0,9246$, $F = 0,009$) nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v průměrném počtu vajec nakladeném jednou samicí, jak ukazuje tabulka V. Průměrný počet vykladených vajíček jednou samicí v časových intervalech zobrazují následující grafy (obrázky 11 - 13).

Tab. V: Průměrný počet vajíček nakladených jednou samicí – porovnání skupin sajících krev s přidaným serotoninem, histaminem nebo prostaglandinem E₂ s kontrolními skupinami. Rozdíly mezi skupinami nebyly signifikantní: serotonin (GLM, $p = 0,503$, $F = 0,4541$), histamin (GLM, $p = 0,479$, $F = 0,5031$), prostaglandin E₂ (GLM, $p = 0,9246$, $F = 0,009$).

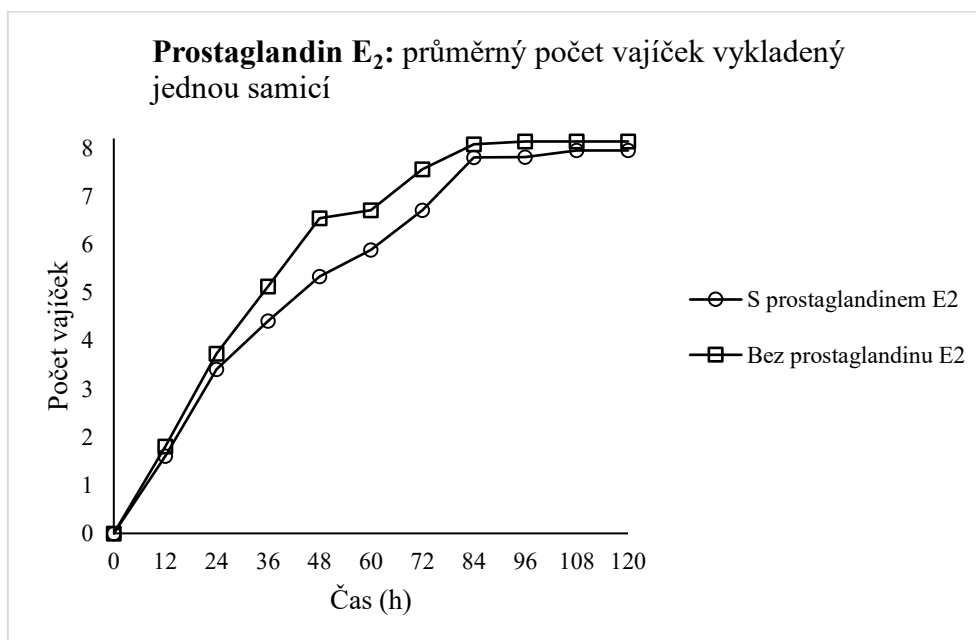
Skupina	Histamin	Serotonin	Prostaglandin E ₂
Kontrolní	14,63	6,41	8,14
Pokusná	16,62	7,62	7,95



Obr. 11: Průměrný počet vajíček vykladený jednou samicí *P. papatasi* sající krev s přidaným histaminem. Graf zachycuje průměrný počet nakladených vajíček jednou samicí ve skupině o 181 jedincích sající krev s přidaným histaminem a ve skupině o 156 jedincích sající krev bez přidaného histaminu v závislosti na čase. V čase 0 (120 hodin po sání) byly samice *P. papatasi* odděleny do skleniček.



Obr. 12: Průměrný počet vajíček nakladených jednou samicí *P. argentipes* ve skupinách sajících krev s přidáním serotoninem a bez něj. V experimentální skupině bylo celkem 151 samic, ve skupině kontrolní 128 samic, samice byly odděleny 48 hodin po sání (čas 0).

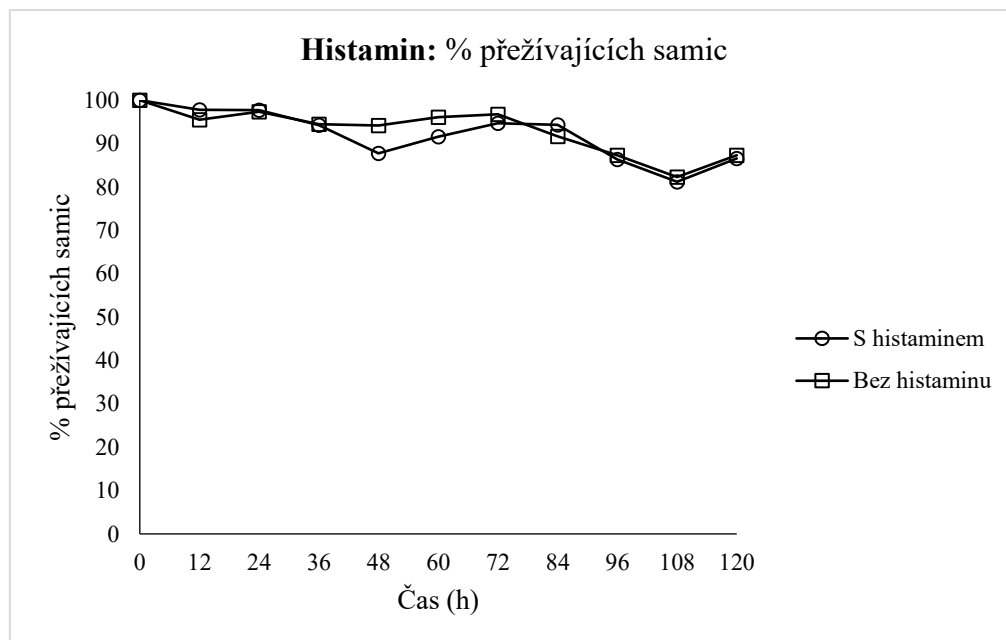


Obr. 13: Průměrný počet vajíček nakladených jednou samicí *P. argentipes* sající krev s přidáním prostaglandinem E₂. Graf zobrazuje průměrný počet vajíček nakladených jednou samicí v časových intervalech po 12 hodinách od umístění do skleniček (48 hodin po sání). Skupina sající krev s přidáním prostaglandinem E₂ (S prostaglandinem E₂) sestávala ze 104 samic, skupina sající krev bez PGE₂ (Bez prostaglandinu E₂) 101 samic *P. argentipes*.

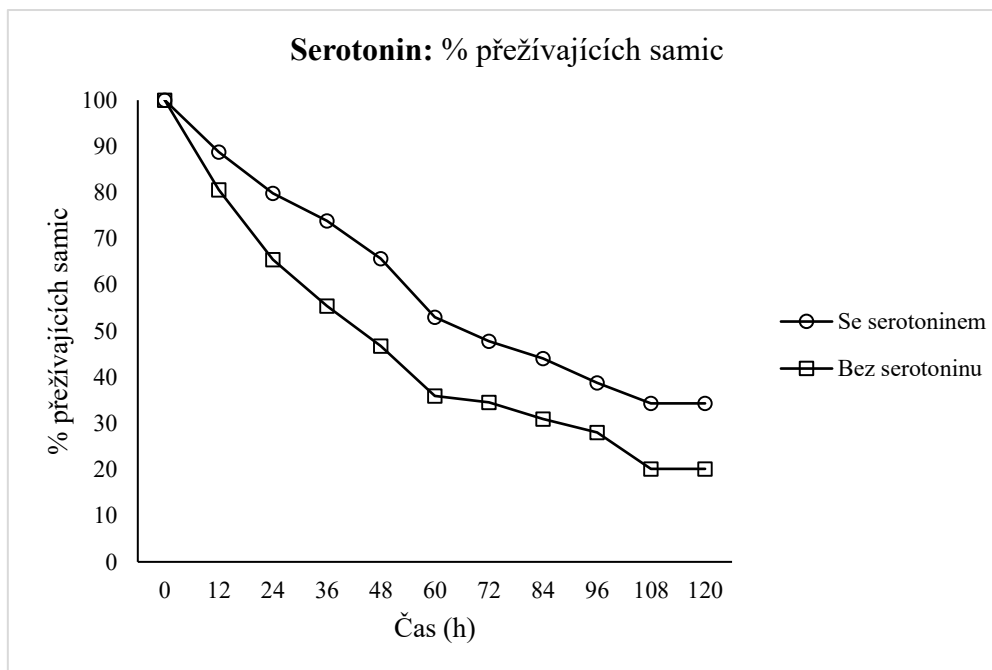
Samice sátena na krev se serotoninem měly signifikantně nižší mortalitu než kontrolní skupina ($\chi^2 = 6,25$, $df = 1$, $p = 0,01243$). Mortalita samic sajících krev s přidaným histaminem ($\chi^2 = 2,74$, $df = 1$, $p = 0,09786$) nebo prostaglandinem E_2 ($\chi^2 = 1,6971$, $df = 1$, $p = 0,1927$) se signifikantně nelišila od mortality kontrol. Úmrtnost samic (%) v pokusných a kontrolních skupinách shrnuje tabulka VI a % přežívajících samic v závislosti na čase zobrazují grafy (obrázek 14 – 16). V tabulce VII je zaznamenán přehled mortality nuliparních samic v jednotlivých skupinách, z nichž se od kontroly nejvíce lišila ve skupině samic sajících krev s histaminem - byla u této skupiny téměř dvojnásobná (32%) oproti kontrole (16,7%).

Tab. VI: Mortalita u samic sajících krev s biogenními aminy nebo prostaglandinem E_2 a u kontrol.

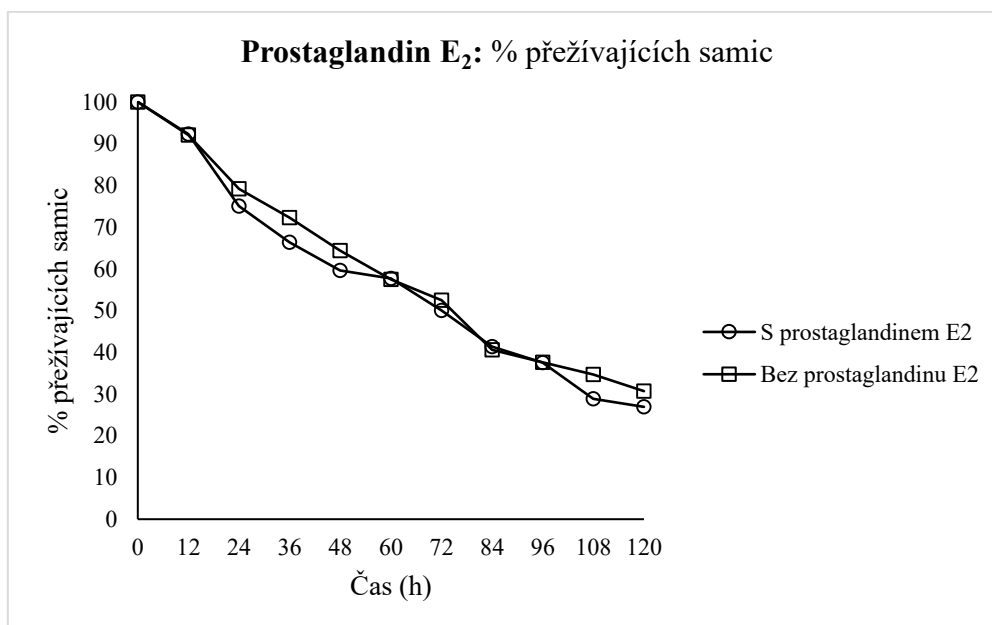
Skupina	Histamin	Serotonin	Prostaglandin E_2
Kontrolní	55,8% 87/156	79,9% 111/139	74% 77/104
Pokusná	65,2% 118/181	65,7% 88/134	69,3% 70/101



Obr. 14: Procento přežívajících samic *P. papatasi* sajících krev s přidaným histaminem. Grafu porovnává % přežívajících samic, které sály králíčí krev s přidaným histaminem (181 samic) a samic, kterým byla podána samotná krev (156 samic) v časových intervalech od 0. hodiny (samice odděleny do skleniček 120 hodin po sání).



Obr. 15: Přežívající samice *P. argentipes* sající krev s přidaným serotoninem. Graf srovnává % přežívajících samic od hodiny 0 (samice odděleny do skleniček 48 hodin po sání) ve skupině sající přes kuřecí membránu králíčí krev, do které byl přidán serotonin (151 samic) a ve skupině sající krev bez přidaného serotoninu (128 samic).



Obr. 16: Přežívající samice *P. argentipes* sající krev s prostaglandinem E₂. Graf porovnává % přežívajících samic, které přijaly krev s přidaným prostaglandinem v 0. – 120. hodině (celkem 104 jedinců) a kontrolních samic sající krev bez přidaného prostaglandinu E₂ (celkem 101 samic). Samice byly odděleny do skleniček 48 hodin po sání.

Tab. VII: Mortalita nuliparních samic sajících krev s histaminem ($\chi^2 = 9,782$, $df = 1$, $p = 0,0018$), serotoninem ($\chi^2 = 0,0178$, $df = 1$, $p = 0,8938$) nebo prostaglandinem E₂ ($\chi^2 = 0$, $df = 1$, $p = 1$) a u kontrol.

Skupina	Histamin	Serotonin	Prostaglandin E₂
Kontrolní	16,7% 26/156	59% 82/139	28% 29/104
Pokusná	32% 58/181	57,5% 77/134	29% 29/101

5 DISKUZE

Při opakovaném pobodání krevsajícím hmyzem či klíšťaty dochází u hostitele ke vzniku specifické buněčné a protilátkové odpovědi proti slinám parazita. Zatímco u klíšťat *Boophilus microplus* výzkum protilátkové odpovědi vyústil ve výrobu vakcíny, u flebotomů není efekt imunitní odpovědi hostitele jednoznačný. Cílem pokusů bylo zjistit, zda samice *P. argentipes* sající na křečkovi imunizovaném opakovanou expozicí těmto flebotomům mají změněnou mortalitu a fekunditu. Tato kombinace parazita a hostitele byla zvolena po vzoru studie Ghosh a Mukopadhyay (1998), mimo jiné i proto, že k pokusům nebylo možné použít přirozené hostitele *P. argentipes*, jimiž jsou skot a člověk.

Z výsledků pokusů vyplývá, že **počet nakladených vajec** není ovlivněn přítomností protilátek proti slinným antigenům *P. argentipes* v krvi křečka. Ačkoli Ghosh a Mukhopadhyay (1998) neuvádí počty nakladených vajec samicemi, zmiňují jejich postupné snižování ve skupinách samic *P. argentipes* sajících na imunizovaném křečkovi.

Naše výsledky týkající se fekundity flebotomů jsou v souladu s údaji popsanými některými autory u *P. duboscqi*: Kaburi a kol. (2011) popsali, že specifická imunita proti slinám parazita nemá to vliv na fekunditu vektora. Opačné poznatky byly získány pokusy s *Lu. longipalpis*, z nichž vyplynulo, že samice sající na hostiteli majícím protilátky proti slinám flebotoma kladou méně vajíček. U toho samého flebotoma bylo pozorováno, že stejný efekt má také imunizace homogenátem střeva anebo rekombinantním maxadilánem (Milleron a kol., 2004; Vilela a kol., 2006). Zdá se, že mnohem větší vliv na fekunditu flebotoma má imunizace jeho tkáněmi než slinami, protože v protikladu s výše zmíněnými experimenty s *P. duboscqi* měly samice sající na hostiteli imunizovaném homogenátem ze tkání tohoto flebotoma nebo ze střeva nižší fekunditu než samice kontrolní (Ingonga a kol., 1996).

Pozorování **mortality** samic *P. argentipes* sajících na opakovaně exponovaném hostiteli ukázalo, že ani jejich úmrtnost patrně není ovlivněna přítomností protilátek proti slinám tohoto flebotoma. Stejně tomu bylo také u *P. duboscqi*, jehož úmrtnost se nelišila od kontrol (Kaburi a kol., 2011). Naopak v pokusech se samicemi flebotomů, v nichž byl hostitel imunizován tělem nebo střevem flebotoma nebo v případě *Lu. longipalpis* slinami anebo maxadilánem (Ingonga a kol. 1996; Milleron a kol., 2004; Vilela a kol., 2006) byla současně také pozorována vyšší mortalita s výjimkou těch, které sáli na hostiteli s protilátkami proti PpChit1 a hynuly později (Robles-Murguía a kol., 2014).

U *P. argentipes* Ghosh a Mukopadhyay (1998) pozorovali, že se o 40% zvýšila mortalita nuliparních samic, pokud sály na desetkrát pobodaném křečkovi, oproti samicím sajícím na křečkovi naivním. Dvojnásobně se mortalita samic zvýšila také při sání krve přes kuřecí membránu, pokud do ní bylo přidáno sérum s protilátkami proti slinám *P. argentipes*. Z publikace vyplývá, že byly pokusy opakovány pokaždé s jinou skupinou flebotomů, avšak již není zřejmé, zda byly prováděny vždy souběžně s negativní kontrolou tvořenou stejným počtem stejně starých samic (Ghosh a Mukopadhyay, 1998).

Je zřejmé, že pro pokusy, v nichž se sleduje mortalita a kladení vajíček, je nutné používat pro kontrolní experiment samice stejně staré a pocházející ze stejného chovu, jako pro pokusnou skupinu. O tom, že výsledky podobných pozorování by mohly být bez standardního postupu a správného výběru kontrol zkreslující, svědčí například rozdíl v průměrném počtu nakladených vajec jednou samicí v pokusech se sáním na křečkovi a se sáním na kuřecí membráně. Ačkoli se samice na první pohled v obou případech plně nasály a poté byly chovány ve stejných podmínkách, po sání na kuřecí membráně nakladla každá přibližně o polovinu méně vajec než samice sající na křečkovi. Tento fakt může být způsoben změněným fitness celé kolonie anebo například jinou roční dobou.

Protilátky proti slinám flebotoma by mohly mít neutralizační efekt na některé slinné proteiny, podobně jak popsali Milleron a kol. (2004) v případě protilátek proti maxadilanu. To by mohlo znesnadňovat flebotomovi příjem krve. Nedostatečný zdroj bílkovin by mohl mít za důsledek nižší počet nakladených vajíček, případně dřívější úhyn samice. Výraznější účinek by však mohla mít imunizace hostitele tkáněmi střeva. Mechanismus účinku protilátek proti střevu flebotoma není znám, teoreticky by však mohlo docházet ke zhoršené absorpci živin vlivem opsonizace nebo k poškození tkání vlivem komplementu. Vzhledem k vlivu, jaký má sání na hostiteli imunizovaném zejména homogenátem střeva na hematofágního parazita (Ingonga a kol., 1996; Milleron a kol., 2004; Vilela a kol., 2006; Robles-Murguía a kol., 2014), by mohlo být zajímavé sledovat fekunditu a mortalitu samic *P. argentipes* sajících na hostitelích těmito tkáněmi.

Protilátky ze sér imunizovaných křečků rozeznávaly **slinné antigeny**, z nichž některé byly popsány již dříve jako SP06 protein, antigen 5-related protein, apyráza a yellow-related proteiny (Anderson a kol., 2006). Některé proteiny s vyšší molekulovou hmotností, jako D7 protein, byly nalezeny i v proteinových proužcích mezi 20 - 25 kDa. Může se jednat o fragmenty tohoto proteinu. Navíc, v oblasti mezi 20 kDa a 25 kDa séra silně rozpoznávala více antigenů a u některých antigenních proužků nelze jednoznačně určit, zda je reakce

způsobená fragmenty známých antigenů (D7, SP06, SP04, SP03) anebo některým z dalších, doposud necharakterizovaných proteinů. Obdobně nejasná je situace u antigenních proužků s molekulovou hmotností nad 50 kDa, kde se sice při imunoblotu tvoří silný pruh, ale žádný z již popsanych proteinů této hmotnosti neodpovídá.

Jednoznačnou identifikaci imunogenních proteinů ze slin *P. argentipes* komplikuje jeho odlišnost od ostatních druhů flebotomů, pro kterou nelze jeho slinný profil jednoduše porovnat s jinými, jako je tomu např. u podrodu *Larroussius*. *Phlebotomus argentipes* je jediným zástupcem podrodu *Euphlebotomus*, který je chován v laboratorních koloniích (P. Volf, osobní sdělení).

Jedním z faktorů, které by teoreticky při sání na senzibilizovaném hostiteli mohly mít vliv na mortalitu a fekunditu flebotoma, jsou **biogenní aminy**, které se při poškození tkáně uvolňují do krve. Pro pokusy byly zvoleny histamin a serotonin, protože jsou to hlavní mediátory zánětu. Další testovanou látkou byl prostaglandin E₂, který je také nedílnou součástí zánětlivé reakce a stejně jako předchozí dvě látky účinkuje i v organismu dvoukřídlého hmyzu.

Histamin byl pro experiment použit v koncentraci téměř o čtyři řády vyšší, než se vyskytuje v krvi zdravého člověka (Jackson a kol., 1998). Ačkoli průměrný počet nakladených vajec jednou samicí se signifikantně nelišil, úmrtnost nuliparních samic byl téměř dvakrát vyšší. Mortalita všech samic (nuliparních i kladoucích) se však nelišila. Zdá se proto, že koncentrace histaminu mnohokrát vyšší než se vyskytuje v krvi zdravého člověka, by mohla mít vliv na trávení krve *P. papatasi*. Je však třeba prostudovat efekt histaminu na *P. argentipes*, tedy provést pokus, který z důvodu zhoršeného stavu kolonie nebylo možné uskutečnit během diplomové práce. Navíc by mohlo být užitečné ověřit, jaká je skutečná koncentrace histaminu v krvi nasáté flebotomem z opakovaně pobodaného hostitele a tuto koncentraci použít pro experimentální sání.

Serotonin byl samicím podán v koncentraci 50 – 150 krát vyšší, než jaká se udává pro jeho normální koncentraci v séru (Landau a kol., 2016). V tomto pokusu se sice se nelišila fekundita samic sající krev se serotoninem od kontrol, ale mortalita byla v experimentální skupině nižší. Je nepravděpodobné, že by serotonin měl na samice *P. argentipes* ochranný efekt a výsledek proto nelze vysvětlit žádnou rozumnou hypotézou. Pro ověření tohoto tvrzení by bylo vhodné pokus zopakovat se stejným druhem flebotoma.

V případě prostaglandinu E₂ výsledky pokusů naznačují, že ani 1200x vyšší koncentrace, než jaká se vyskytuje v séru zdravých lidí (D'Euferia a kol., 2008), neovlivňuje fekunditu nebo mortalitu samic *P. argentipes*.

Vazba serotoninu a histaminu na yellow-related proteiny a dalších biogenních aminů, sloužící u flebotomů k jejich eliminaci, doposud není plně objasněna. Na základě první popsané 3D struktury LJM11 u *Lutzomyia longipalpis* (Xu a kol., 2011) byly vytvořeny modely dalších yellow-proteinů. Díky jejich podobné struktuře se lze domnívat, že i u jiných druhů flebotomů slouží tyto proteiny k vyvazování biogenních aminů. Značně konzervované jsou také jejich aminokyselinové sekvence – ve vazebné kapse se z jedenácti známých aminokyselin (Xu a kol., 2011) pět shoduje ve všech 32 yellow-related proteinech (Šíma a kol., 2016). Doposud bylo identifikováno celkem 32 yellow-related proteinů u 13 druhů flebotomů s publikovaným slinným transkriptomem (Xu a kol., 2011). Jejich zastoupení se u flebotomů liší. Zatímco například u *P. sergenti* bylo nalezeno pět yellow-related proteinů, u *P. argentipes* pouze jeden – SP04 o molekulové hmotnosti 43 kDa (Šíma a kol., 2016). Tento protein byl pomocí hmotnostní spektrometrie zaznamenán i v našem pokusu.

Na základě výsledků experimentů s membránovým sáním se lze jen domnívat, že nevyvázané aminy ovlivňují spíše příjem krve tím, že vyvolávají bolest a svědění, v důsledku čehož se hostitel ektoparazita snaží zbavit. Překážkou ve vytvoření podmínek blížících se skutečnému sání na hostiteli zůstává nepřesně zmapovaná koncentrace histaminu, serotoninu i prostaglandinů v kůži hostitele. Jejich zastoupení se liší mezi jednotlivými druhy obratlovců, ale je různé také v závislosti na předchozí expozici, dispozicích a stavu imunitního systému. Z důvodu krátkého poločasu rozpadu v krvi je obtížné stanovit jejich přesnou koncentraci ihned po expozici a v klinické praxi toto nemá využití. Stanovují se pouze metabolity histaminu v případě anafylaxe.

V histologické části diplomové práce byla zjišťována okamžitá kožní reakce křečka na pobodání flebotomem. Ušní boltce byly odebrány po vykrvení imunizovaných i naivních křečků 1 hodinu po sání. Ačkoli na pokožce uší byla po pobodání makroskopicky patrná světlejší místa po sání flebotoma, na histologických řezech barvených hematoxylinem-eosinem nebyly vidět žádné známky otoku nebo poškození tkáně. Negativní výsledek přineslo i pozorování řezů barvených toluidinovou modří, na kterých byly hledány známky infiltrace granulocytů anebo degranulace mastocytů. I dlouhodobé pozorování křečků po expozici flebotomů nasvědčuje tomu, že nevytvářejí žádnou hypersenzitivní odpověď. Pro přesnější zmapování kožních reakcí křečků na poštípání flebotomem by bylo vhodné provést excize v časové řadě. První odběr tkáně by byl proveden ihned po poštípání, další po 6 hodinách, neboť tolik času podle Belkaid a kol. (2000b) potřebují zánětlivé buňky pro vcestování do místa vpichu a další po 48 hodinách pro případnou identifikaci DTH. Současně by bylo výhodné

zmapovat proces desenzibilizace u křečků, neboť není známo, po kolika expozicích k ní dochází.

6 SHRNUTÍ

1. Na 6 křečcích imunizovaných šestinásobným opakovaným sáním *P. argentipes* bylo nasáto celkem 312 samic, na 6 naivních křečcích celkem 318 samic tohoto druhu flebotoma. Nasáté samice byly sledovány po dobu pěti dní ve dvanáctihodinových intervalech.
2. V séru imunizovaných křečků byly metodou ELISA prokázány vysoké hladiny IgG protilátek proti slinám *P. argentipes*. Sání na imunizovaných křečcích však neovlivnilo mortalitu ani fekunditu samic *P. argentipes*. Úmrtnost ve skupině sající na imunizovaném křečkovi se signifikantně nelišila od té ve skupině, která sála na křečcích kontrolních.
3. Western blottingem se séry imunizovaných křečků a analýzou proteinového profilu slinných žláz *P. argentipes* pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že nejintenzivněji rozeznávanými antigeny slin jsou proteiny odpovídající antigen 5-related proteinu, D7 proteinům, apyráze a yellow-related proteinům.
4. Z uší křečků sátých flebotomy *P. argentipes* byly zhotoveny histologické řezy, z nichž část byla obarvena hematoxylinem-eosinem a část toluidinovou moří. Řezy exponovaných uší se nelišily od uší kontrolních křečků a nenesly známky změn spojených s hypersenzitivní reakcí nebo zánětem.
5. Efekt biogenních aminů na fekunditu a mortalitu byl studován u flebotomů *P. argentipes* a *P. papatasi* sátých na krvi s přidaným histaminem, serotoninem nebo prostaglandinem E₂. Ve skupině *P. papatasi* sající krev s histaminem zahynulo více nuliparních samic ve srovnání s kontrolou, v ostatních skupinách se mortalita nevykladených samic nelišila. V mortalitě všech samic nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi pokusnou a kontrolní skupinou, vyjma skupiny *P. argentipes* sající krev se serotoninem, v níž byla úmrtnost v porovnání s kontrolou nižší. Průměrný počet vajíček nakladených jednou samicí se v žádné skupině signifikantně nelišil od kontrol.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Andersen J. F., 2010: Structure and mechanism in salivary proteins from bloodfeeding arthropods. *Toxicon*. 56 (7): 1120 - 1129.
2. Anderson J. M., Oliveira F., Kamhawi S., Mans B. J., Reynoso D., Seitz A. E., Lawyer P., Garfield M., Pham M., Valenzuela J. G., 2006: Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*. 7: 52.
3. Belkaid Y., Kamhawi S., Modi G., Valenzuela J., Noben-Trauth N., Rowton E., Ribeiro J., Sacks D. L., 1998: Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med*. 188 (10): 1941 - 1953.
4. Belkaid Y., Mendez S., Lira R., Kadambi N., Milon G., Sacks D., 2000a: A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*. 165 (2): 969 - 977.
5. Belkaid Y., Valenzuela J. G., Kamhawi S., Rowton E., Sacks D. L., Ribeiro J. M., 2000b: Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: an adaptive response induced by the fly? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97 (12): 6704 - 6709.
6. Betz M., Fox B. S., 1991: Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol*. 146 (1): 108 - 113.
7. Biedermann T., Kneilling M., Mailhammer R., Maier K., Sander C. A., Kollias G., Kunkel S. L., Hültner L., Röcken M., 2000: Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med*. 192 (10): 1441 - 1452.
8. Bora D., 1999: Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. *Natl Med J India*. 12 (2): 62 - 68.
9. Carregaro V., Valenzuela J. G., Cunha T. M., Verri W. A., Grespan R., Matsumura G., Ribeiro J. M., Elnaïem D. E., Silva J. S., Cunha F. Q., 2008: Phlebotomine salivas inhibit immune inflammation-induced neutrophils migration via an autocrine DC-derived PGE₂/IL-10 sequential pathway. *J Leukoc Biol*. 84 (1): 104 - 114.
10. Cavalcante R. R., Pereira M. H., Gontijo N. F., 2003: Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology*. 127 (1): 87 - 93.

11. Chinzei Y., Minoura H., 1988: Reduced oviposition in *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae) fed on tick-sensitized and vitellin-immunized rabbits. *J Med Entomol* 25 (1): 26 - 31.
12. Chowdhury R., Kumar V., Mondal D., Das M. L., Das P., Dash A. P., Kroeger A., 2016: Implication of vector characteristics of *Phlebotomus argentipes* in the kala-azar elimination programme in the Indian sub-continent. *Pathog Glob Health*. 110 (3): 87 - 96.
13. Clements M. F., Gidwani K., Kumar R., Hostomska J., Dinesh D. S., Kumar V., Das P., Müller I., Hamilton G., Volfova V., Boelaert M., Das M., Rijal S., Picado A., Volf P., Sundar S., Davies C. R., Rogers M. E., 2010: Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am J Trop Med Hyg*. 82 (5): 801 - 807.
14. Cox J., Hein M. Y., Luber C. A., Paron I., Nagaraj N., Mann M., 2014: Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*. 13 (9): 2513 - 2526.
15. Dai J., Narasimhan S., Zhang L., Liu L., Wang P., Fikrig E., 2010: Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent. *PLoS Pathog*. 6 (11): e1001205.
16. D'Eufemia P., Finocchiaro R., Celli M., Zambrano A., Tetti M., Villani C., Persiani P., Mari E., Zicari A., 2008: High levels of serum prostaglandin E2 in children with osteogenesis imperfecta are reduced by neridronate treatment. *Pediatr Res*. 63 (2): 203 - 206.
17. Demeure C. E., Brahimi K., Hacini F., Marchand F., Péronet R., Huerre M., St.-Mezard P., Nicolas J., Brey P., Delespesse G., Mécheri S., 2005: *Anopheles* mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. *J Immunol*. 174 (7) 3932 - 3940.
18. de Moura T. R., Oliveira F., Rodrigues G. C., Carneiro M. W., Fukutani K. F., Novais F. O., Miranda J. C., Barral-Netto M., Brodskyn C., Barral A., de Oliveira C. I., 2010: Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania brasiliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 4 (6): e712.
19. Dinesh D. S., Ranjan A., Palit A., Kishore K., Kar S. K., 2001: Seasonal and nocturnal landing/biting behaviour of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae). *Ann Trop Med Parasitol*. 95 (2): 197 - 202.

20. Donovan M. J., Messmore A. S., Scrafford D. A., Sacks D. L., Kamhawi S., McDowell M. A., 2007: Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. *Infect Immun.* 75 (5): 2523 - 2530.
21. Garcia E. S., Castro D. P., Figueiredo M. B., Azambuja P., 2010: Immune homeostasis to microorganisms in the guts of triatomines (Reduviidae) - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105 (5): 605 - 610.
22. García Gil de Muñoz F. L., Martínez-Barnetche J., Lanz-Mendoza H., Rodríguez M. H., Hernández-Hernández F. C., 2008: Prostaglandin E₂ modulates the expression of antimicrobial peptides in the fat body and midgut of *Anopheles albimanus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 68 (1): 14 - 25.
23. Ghosh K. N., Mukhopadhyay J., 1998: The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol.* 28 (2): 275 - 281.
24. Gomes R., Oliveira F., 2012: The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. *Front Immunol.* 3: 110.
25. Gulia M., Suneja A., Gakhar S. K., 2002: Effect of anti-mosquito hemolymph antibodies on fecundity and on the infectivity of malarial parasite *Plasmodium vivax* to *Anopheles stephensi* (Diptera: Insecta). *Jpn J Infect Dis.* 55 (3): 78 - 82.
26. Haskó G., Szabó C., Németh Z. H., Kvetan V., Pastores S. M., Vizi E. S., 1996: Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol.* 157 (10): 4634 - 4640.
27. Hatfield P. R., 1988: Anti-mosquito antibodies and their effects on feeding, fecundity and mortality of *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol.* 2 (4): 331 - 338.
28. Hecht M. M., Bussacos A. C., Lozzi S. P., Santana J. M., Teixeira A. R. L., 2006: *Triatoma infestans* chooses to feed upon immune prey. *Am J Trop Med Hyg.* 75 (5): 893 - 900.
29. Hillyer J. F., Estévez-Lao T. Y., Mirzai H. E., 2015: The neurotransmitters serotonin and glutamate accelerate the heart rate of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 188: 49 - 57.
30. Hostomská J., Rohoušová I., Volfová V., Stanneck D., Mencke N., Volf P., 2008: Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8 (4): 443 - 450.
31. Humphrey J. H., Jaques R., 1954: The histamine and serotonin content of the platelets and polymorphonuclear leucocytes of various species. *J Physiol.* 124 (2): 305 - 310.
32. Ingonga P., Mbatia P. A., Anjili C. O., Mutani A., Wishitemi B., Odongo S., Robert L. L., Githure J. I., 1996: The effect of immune sera from hamsters immunized with sandfly gut

- and whole body extract antigens on the fecundity and mortality of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *Acta Trop.* 60 (4): 269 - 279.
33. Inokuma H., Kemp D. H., Willadsen P., 1994: Prostaglandin E₂ production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen. *Vet. Parasitol.* 53 (3 - 4): 293 - 299.
 34. Ishihama Y., 2005: Proteomic LC-MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1067 (1-2): 73 - 83.
 35. Jackson J. A., Riordan H. D., Neathery S., Revard C., 1998: Histamine levels in health and disease. *J Orthol Med.* 13 (4): 236 - 240.
 36. James A. A., Blackmer K., Marinotti O., Ghosn C. R., Racioppi J. V., 1991: Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*. *Mol Biochem Parasitol.* 44 (2): 245 - 253.
 37. Jittapalapong S., Stich R., W., Gordon J., C., Wittum T. E., Barriga O. O., 1999: Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. *J Med Entomol.* 37 (4): 601 - 611.
 38. Kaburi J. C., Ngumbi P. M., Anjili C. O., 2011: Sandfly-saliva injected during repeated feeding on a sensitized hamster causes fecundity and mortality to female *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *J Vector Borne Dis.* 48 (1): 61 - 63.
 39. Kamhawi S., Belkaid Y., Modi G., Rowton E., Sacks D., 2000: Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science.* 290 (5495): 1351 - 1354.
 40. Kemp D. H., Agbede R. I. S., Johnston L. A. Y., Gough J. M., 1986: Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *Int J Parasitol.* 16 (2): 115 - 120.
 41. Kemp D. H., Bourne A., 1980: *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle-tick larvae – studies *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology.* 80 (3): 487 - 496.
 42. Killby V. A., Silverman P. H., 1967: Hypersensitive reactions in man to specific mosquito bites. *Am J Trop Med Hyg.* 16 (3): 374 - 380.
 43. King T. P., Kochoumian L., Lam T., 1987: Immunochemical observations of antigen 5, a major venom allergen of hornets, yellowjackets and wasps. *Mol Immunol.* 24 (8): 857 - 864.

44. Krinsky W. L., 1985: Feeding, molting, and egg production in *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) fed repeatedly on the same swiss mouse hosts. *J Med Entomol.* 22 (6): 670 - 674.
45. Kumar V., Shankar L., Rama A., Das P., 2015: Analysing host preference behavior of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) under the impact of indoor residual spray. *Int J Trop Dis Health.* 7 (2): 69 - 79.
46. Landau M., Wisniewski S., Davison J., 2016: Jejunoileal neuroendocrine tumors complicated by intestinal ischemic necrosis are associated with worse overall survival. *Arch Pathol Lab Med.* 140 (5): 461 - 466.
47. Lange A. B., Orchard I., Lloyd R. J., 1988: Immunohistochemical and electrochemical detection of serotonin in the nervous system of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 8 (3): 187 - 201.
48. Lange A. B., Orchard I., Barrett F. M., 1989: Changes in haemolymph serotonin levels associated with feeding in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol.* 35 (5): 393 - 397.
49. Lerner E. A., Ribeiro J. M., Nelson R. J., Lerner M. R., 1991: Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem.* 266 (17): 11234 - 11236.
50. Li J. T. C., Reed C. E., 1985: Allergies related to mosquitoes, repellents, and insecticides. *J Minn Acad Sci.* 50 (3): 21 - 24.
51. Mans B. J., Calvo E., Ribeiro J. M., Andersen J. F., 2007: The crystal structure of D7r4, a salivary biogenic amine-binding protein from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem.* 282 (50): 36626 - 36633.
52. Martín-Martín I., Molina R., Jiménez M., 2013: Identifying salivary antigens of *Phlebotomus argentipes* by a 2DE approach. *Acta Trop.* 126 (3): 229 - 239.
53. Martín-Martín I., Molina R., Jiménez M., 2015: Kinetics of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in experimentally bitten mice and rabbits. *PLoS One.* 10 (11): e0140722.
54. Marzouki S., Ben Ahmed M., Boussoffara T., Abdeladhim M., Ben Aleya-Bouafif N., Namane A., Hamida N. B., Ben Salah A., Louzir H., 2011: Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 84 (5): 653 - 661.
55. Merino O., Alberdi P., Pérez de la Lastra J. M., de la Fuente J., 2013: Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 3: 30.

56. Milleron R. S., Ribeiro J. M., Elnaime D., Soong L., Lanzaro G. C., 2004: Negative effect of antibodies against maxadilan on the fitness of the sand fly vector of american visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70 (3): 278 - 285.
57. Mohammad-Zadeh L. F., Moses L., Gwaltney-Brant S. M., 2008: Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Therap.* 31 (3): 187 - 199.
58. Mulenga A., Azad A. F., 2005: The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. *Exp Appl Acarol.* 37 (3 - 4): 215 - 229.
59. Norval R. A. I., Floyd R. B., Kerr J. D., 1988: Ability of adults of *Amblyomma hebraeum* (Acaria: Ixodidae) to feed repeatedly on sheep and cattle. *Veterinary Parasitology.* 29 (4): 351 - 355.
60. Ockenfels B., Michael E., McDowell M. A., 2014: Meta-analysis of the effects of insect vector saliva on host immune responses and infection of vector-transmitted pathogens: a focus on leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 8 (10): e3197.
61. Ohtsuka E., Kawai S., Ichikawa T., Nojima H., Kitagawa K., Shirai Y., Kamimura K., Kuraishi Y., 2001: Roles of mast cells and histamine in mosquito bite-induced allergic itch-associated responses in mice. *Jpn J Pharmacol.* 86 (1): 97 - 105.
62. Qian Y., Yuan J., Essenberg R. C., Bowman A. S., Shook A. L., Dillwitha J. W., Sauer J. R., 1998: Prostaglandin E₂ in the salivary glands of the female tick, *Amblyomma americanum* (L.): calcium mobilization and exocytosis. *Ins Bioch Mol Biol.* 28 (4): 221 - 228.
63. Ramalho-Ortigão J. M., Kamhawi S., Joshi M. B., Reynoso D., Lawyer P. G., Dwyer D. M., Sacks D. L., Valenzuela J. G., 2005: Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Mol Biol.* 14 (6): 703 - 712.
64. Ramasamy M. S., Ramasamy R., Kay B. H., Kidson C., 1988: Anti-mosquito antibodies decrease the reproductive capacity of *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol.* 2 (1): 87 - 93.
65. Ramasamy M. S., Srikrishnaraj K. A., Wijekoone S., Jesuthasan L. S. B., Ramasamy R., 1992: Host immunity to mosquitoes: effect of antimosquito antibody on *Anopheles tessellatus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 29 (6): 934 - 938.
66. Raza N., Lodhi M. S., Ahmed S., Dar N. R., Ali L., 2008: A clinical study of papular urticaria. *J Coll Physicians Surg Pak.* 18 (3): 147 - 150.
67. Reite O. B., 1972: Comparative physiology of histamine. *Physiol Rev.* 52 (3): 778 - 819.

68. Ribeiro, J. M. C., 1982: The antiserotonin and antihistamine activities of salivary secretion of *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol.* 28 (1): 69 - 75.
69. Ribeiro J. M. C., Sarkis J. J. F., Rossigno P. A., Spielman A., 1984: Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp Biochem Physiol B.* 79 (1): 81 - 86.
70. Ribeiro J. M. C., Modi G. B., Tesh R. B., 1989: Salivary apyrase activity of some old world phlebotomine sand flies. *Insect Biochem.* 19 (4): 409 - 412.
71. Ribeiro J. M. C., Modi G. B., 2001: The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar. *J Parasitol.* 87 (4): 915 - 917.
72. Ricciotti E., Fitzgerald G. A., 2011: Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31 (5): 986 - 1000.
73. Ringvall M., Rönnerberg E., Wernersson S., Duelli A., Henningsson F., Abrink M., García-Faroldi G., Fajardo I., Pejler G., 2008: Serotonin and histamine storage in mast cell secretory granules is dependent on serglycin proteoglycan. *J Allergy Clin Immunol.* 121 (4): 1020 - 1026.
74. Robles-Murguía M., Bloedow N., Murray L., Ramalho-Ortigão M., 2014: Effect of mouse antisera targeting the *Phlebotomus papatasi* midgut chitinase PpChit1 on sandfly physiology and fitness. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109 (8): 1064 - 1069.
75. Rohoušová I., Volf P., 2006: Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol.* 53 (3): 161 - 171.
76. Rohoušová I., Subrahmanyam S., Volfová V., Mu J., Volf P., Valenzuela J. G., Jochim R. C., 2012: Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 6 (5): e1660.
77. Sangamnatdej S., Paesen G. C., Slovak M., Nuttall P. A., 2002: A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Mol Biol.* 11 (1): 79 - 86.
78. Sauer J. R., Essenberg R. C., Bowman A. S., 2000: Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *J Ins Physiol.* 46 (7): 1069 - 1078.
79. Settembrini B., Villar M. J., 2004: Distribution of serotonin in the central nervous system of the blood-feeding heteropteran, *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *J Morphol.* 260 (1): 21 - 32.
80. Shahid M., Tripathi T., Sobia F., Moin S., Siddiqui M., Khan R. A., 2009: Histamine, histamine receptors, and their role in immunomodulation: an updated systematic review. *Open Immunol J.* 2 (7): 9 - 41.

81. Stanley D., Kim Y., 2011: Prostaglandins and their receptors in insect biology. *Front Endocrinol.* 2: 105.
82. Stauch A., Sarkar R. R., Picado A., Ostyn B., Sundar S., Rijal S., Boelaert M., Dujardin J. C., Duerr H. P., 2011: Visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent: modelling epidemiology and control. *PLoS Negl Trop Dis.* 5 (11): e1405.
83. Sugimoto Y., Narumiya S., 2007: Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.* 282 (16): 11613 - 11617.
84. Šíma M., Novotný M., Pravda L., Sumová P., Rohoušová I., Volf P., 2016: The diversity of yellow-related proteins in sand flies (Diptera: Psychodidae). *PLoS One.* 11 (11): e0166191.
85. Teixeira C. R., Teixeira M. J., Gomes R. B., Santos C. S., Andrade B. B., Raffaele-Netto I., Silva J. S., Guglielmotti A., Miranda J. C., Barral A., Brodskyn C., Barral-Netto M., 2005: Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol.* 175 (12): 8346 - 8353.
86. Teixeira C., Gomes R., Oliveira F., Meneses C., Gilmore D. C., Elnaïem D. E., Valenzuela J. G., Kamhawi S., 2014: Characterization of the early inflammatory infiltrate at the feeding site of infected sand flies in mice protected from vector-transmitted *Leishmania major* by exposure to uninfected bites. *PLoS Negl Trop Dis.* 8 (4): e2781.
87. Thangamani S., Higgs S., Ziegler S., Vanlandingham D., Tesh R., Wikel S., 2010: Host immune response to mosquito-transmitted chikungunya virus differs from that elicited by needle inoculated virus. *PLoS One.* 5 (8): e12137.
88. Theodos C. M., Titus R. G., 1993: Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunol.* 15 (8): 481 - 487.
89. Titus R. G., Ribeiro J. M., 1988: Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science.* 239 (4845): 1306 - 1308.
90. Tyanova S, Temu T., Sinitcyn P., Carlson A., Hein M. Y., Geiger T., Mann M., Cox J., 2016: The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods.* 13 (9): 731 - 740.
91. Tyce G. M., 1990: Origin and metabolism of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 16 (3): 1 - 7.
92. Valenzuela J. G., Belkaid Y., Garfield M. K., Mendez S., Kamhawi S., Rowton E. D., Sacks D. L., Ribeiro J. M., 2001: Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting

- vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med*. 194 (3): 331 - 342.
93. van Zandbergen, G., Klinger M., Mueller A., Dannenberg S., Gebert A., Solbach W., Laskay T., 2004: Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*. 173 (11): 6521 - 6525.
 94. Vilela M. L., Souza N. A., Oliveira S. M. P., Costa-Pinto D., Cabello P. H., Rangel E. F., Traub-Cseko Y. M., 2006: Considerations on the effect of anti-sandfly antibodies on biological parameters of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Braz. J. Biol.*, 66 (1A): 175 - 183.
 95. Villalobos-Sambucaro M. J., Lorenzo-Figueiras A. N., Riccillo F. L., Diambra L. A., Noriega F. G., Ronderos J. R., 2015: Allatotropin modulates myostimulatory and cardioacceleratory activities in *Rhodnius prolixus* (Stal). *PLoS ONE*. 10 (4): e0124131.
 96. Vleugels R., Verlinden H., Broeck J. V., 2015: Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. *Neurotransmitter*. 2: e314.
 97. Vlková M., Rohoušová I., Drahota J., Stanneck D., Kruedewagen E. M., Mencke N., Otranto D., Volf P., 2011: Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 5 (10): e1344.
 98. Vlková M., Šíma M., Rohoušová I., Košťálová T., Sumová P., Volfová V., Jaske E. L., Barbian K. D., Gebre-Michael T., Hailu A., Warburg A., Ribeiro J. M. C., Valenzuela J. G., Jochim R. C., Volf P., 2014: Comparative analysis of salivary gland transcriptomes of *Phlebotomus orientalis* sand flies from endemic and non-endemic foci of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 8 (2): e2709.
 99. Volf P., Volfová V., 2011: Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vect Ecol*. 36 (s1): S1 – S9.
 100. Wikel S. K., Ramachandra R. N., Bergman D. K., Burkot T. R., Piesman J., 1997: Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infect Immun*. 65 (1): 335 - 338.
 101. Willadsen P., Kemp D. H., Cobon G. S., Wright I. G., 1992: Successful vaccination against *Boophilus microplus* and *Babesia bovis* using recombinant antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 87 (3): 289 - 294.
 102. Xu X., Oliveira F., Chang B. W., Collin N., Gomes R., Teixeira C., Reynoso D., Pham V., Elnaïem D., Kamhawi S., Ribeiro J. M. C., Valenzuela J. G., Andersen J. F., 2011:

Structure and function of a “yellow” protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. *J Biol Chem.* 286 (37): 32383 - 32393.

Internetové zdroje

World Health Organization, 2011 [online]: Leishmaniasis [cit. 14. 11. 2016]. Dostupné z: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.